

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001 年3 月1 日 (01.03.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/14552 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/12, 1/15, 1/19, 1/21, 5/00, C12Q 1/68, C07K 14/47, 16/18, A01K 67/027, G01N 33/53, 33/50 (74) 代理人: 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsushi et al.); 〒300-0847 茨城県土浦市卸町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki (JP).
- (21) 国際出願番号: PCT/JP00/05551 (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.
- (22) 国際出願日: 2000 年8 月18 日 (18.08.2000) (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ: 特願平11/233301 1999 年8 月19 日 (19.08.1999) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 黒川 清 (KUROKAWA, Kiyoshi) [JP/JP]; 〒162-0061 東京都新宿区市谷柳町49 市ヶ谷ヒルズ401 Tokyo (JP).
- (71) 出願人 および (72) 発明者: 宮田敏男 (MIYATA, Toshio) [JP/JP]; 〒259-1132 神奈川県伊勢原市桜台2丁目16-25 エクセル伊勢原102号 Kanagawa (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MEG-1 PROTEIN

(54) 発明の名称: メグー1タンパク質

(57) Abstract: DNA highly frequently expressed in mesangial cells, and a protein (meg-1) encoded by this DNA. These substances are useful in identifying mesangial cells, detecting abnormalities in mesangial cells, etc. Moreover, the function of mesangial cells is clarified based on the function of the above protein. It is therefore expected that the causes of diseases concerning mesangial cell will be discovered thereby. These substances are also expected as being applicable to the treatment, diagnosis, etc. of diseases concerning mesangial cells.

(57) 要約:

本発明は、メサンギウム細胞で高頻度に発現している DNA、そしてこの DNA がコードするタンパク質 (メグー1) を提供する。これらは、メサンギウム細胞の同定、メサンギウム細胞の異常の検出などに有用である。更に、該タンパク質の機能からメサンギウム細胞の機能が明らかになり、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因究明への展開が期待される。また、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等への応用が期待される。

WO 01/14552 A1

明細書

メグー 1 タンパク質

技術分野

本発明は、遺伝子工学の分野に属し、特に腎細胞の遺伝子の単離に関する。

背景技術

体内の 60 兆個もの様々な細胞が、本質的に同一のゲノム DNA を有している。正常な生理学的機能のために、これらの遺伝子の発現は、細胞系統、および細胞が受容するシグナルにより厳密に制御されている。従って、個々の細胞型に発現している遺伝子を解明することは極めて重要である。

メサンギウム細胞(mesangial cell)は、腎糸球体の構造および機能の維持に中心的な役割を果たしている。そしてメサンギウム細胞は、各種腎炎においても中心的な病態生理学的意義を有する。例えばメサンギウム細胞の増殖、および細胞外の糸球体間質マトリックスの蓄積は、慢性腎炎および糖尿病性腎症のような様々な糸球体疾患の患者の糸球体硬化症の重要な病理所見である。従って、メサンギウム細胞で発現している遺伝子を見だしその機能を明らかにすることは、メサンギウム細胞の生物学的性質の解明、メサンギウム細胞に関連する疾患の原因の究明、ひいては、メサンギウム細胞に関連する疾病の治療、診断等に有効である。

メサンギウム細胞のマーカーとしては、ラットでは Thy1 抗原が知られている。しかしこの遺伝子はメサンギウム細胞特異的ではないうえ、ヒトではメサンギウム細胞には発現していない (Miyata T. et al., Immunology (1989); 67: 531-533; Miyata T. et al., Immunology(1990); 69: 391-395)。また、メサンギウム細胞は活性化されると α 平滑筋アクチンを発現することが知られているが、こ

の遺伝子もメサングウム細胞特異的ではない。このように、メサングウム細胞に特徴的な遺伝子については、従来報告がなかった。

なお本発明者は、先にメサングウム細胞に特異的に発現しているタンパク質としてメグシンを報告している (J. Clin. Invest, 1998 Aug 15, 120:4, 828-36)。本発明は、このメグシンとも明確に異なった構造を持つ新規なタンパク質に関する。

発明の開示

本発明は、メサングウム細胞で高度に発現される遺伝子を単離することを課題とする。

本発明者は、ヒトメサングウム細胞のインビトロ培養物から mRNA を単離し、3' 側の cDNA ライブラリーを作成した。そしてこの cDNA ライブラリーに含まれる多数のクローンをランダムに選択してその塩基配列を決定した。次いで決定した塩基配列を、種々の臓器及び細胞から得られた既知の 3' 側の cDNA クローンの塩基配列と比較することによって、メサングウム細胞で特異的に発現しているクローンを選択した。そのうち、メサングウム細胞において特に出現頻度の高い 1 クローンを選択し、5' RACE 法によって完全長 cDNA (3928bp) を単離した。この完全長 cDNA の全塩基配列を決定して本発明を完成した。更に Kozak の翻訳開始コドン进行を明らかにし、オープンリーディングフレーム (ORF) を推定した。この推定アミノ酸配列を持つ本発明によるタンパク質を、本発明者はメグー 1 (Meg-1) と命名した。ヒト・メグー 1 の cDNA の塩基配列を配列番号：1 に、ヒト・メグー 1 の推定アミノ酸配列を配列番号：2 に示した。

このアミノ酸配列について、SwissProt データベースのアミノ酸配列とホモロジー検索を行い、メグー 1 が新規なタンパク質であることを確認した。更に本発明のメグー 1 の推定アミノ酸配列についてモチーフ検索を試みたところ、多くの既知のプロテインホスファターゼに共通するモチーフが見られた。また、核局在

シグナル(nuclear localization signal)スコアが高く、核タンパク質である可能性が示唆された。

更にノーザンブロッティングによりメグー 1 の組織分布をみたところ、メグー 1 は、心および胎盤、次いで脳、骨格筋、腎および脾において高度な発現が観察された。その他に肝で弱い発現が観察され、肺での発現はほとんど観察されなかった。初代継代培養細胞の中では、メサングウム細胞で特に高度に発現していることが特徴的であった。本発明はこれらの知見に基づいて完成されたものである。

即ち、本発明は具体的には以下のポリヌクレオチド、タンパク質、並びにそれらの用途に関する。

〔1〕 下記 (a) から (d) のいずれかに記載のポリヌクレオチド。

(a) 配列番号：1 に記載された塩基配列の蛋白質コード領域を含むポリヌクレオチド。

(b) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(c) 配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

(d) 配列番号：1 に記載された塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

〔2〕 〔1〕 に記載のポリヌクレオチドのいずれかによってコードされる蛋白質。

〔3〕 〔1〕 に記載されたポリヌクレオチドのいずれかを含むベクター。

〔4〕 〔1〕 に記載されたポリヌクレオチドのいずれか、または〔3〕に記載のベクターを保持する形質転換体。

- 〔５〕〔４〕に記載の形質転換体を培養し、発現産物を回収する工程を含む、
〔２〕に記載の蛋白質の製造方法。
- 〔６〕配列番号：１に記載された塩基配列、またはその相補鎖に相補的な塩基配列からなる１５ヌクレオチド以上の鎖長を持つオリゴヌクレオチド。
- 〔７〕〔６〕に記載のオリゴヌクレオチドと被検試料を接触させ、このオリゴヌクレオチドのハイブリダイズを観察する工程を含む、配列番号：１に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドの検出方法。
- 〔８〕〔６〕に記載のオリゴヌクレオチドと被検試料を接触させ、このオリゴヌクレオチドをプライマーとして相補鎖を合成する工程を含む、配列番号：１に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドの合成方法。
- 〔９〕〔６〕に記載のオリゴヌクレオチドを含むメサングウム細胞の検出用試薬。
- 〔１０〕 生体試料中における〔１〕に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定し、正常試料から得られた測定値と比較することによってメサングウム増殖性腎炎を検出する方法。
- 〔１１〕 生体試料がメサングウム細胞である〔１０〕に記載の方法。
- 〔１２〕 発現レベルを、配列番号：１に記載の塩基配列から選択された塩基配列からなる mRNA を指標として測定する〔１０〕に記載の方法。
- 〔１３〕 発現レベルを、〔２〕に記載のタンパク質またはその断片を指標として測定する〔１０〕に記載の方法。
- 〔１４〕 〔１〕に記載のポリヌクレオチド、またはその一部に対するアンチセンスポリヌクレオチド。
- 〔１５〕 〔２〕に記載の蛋白質を認識する抗体。
- 〔１６〕 配列番号：２のアミノ酸配列から選択されたアミノ酸配列を持つタンパク質の一部を認識する〔１５〕に記載の抗体。

〔17〕 〔15〕に記載の抗体と〔2〕に記載のタンパク質、またはその断片との免疫学的な結合に基づいて〔2〕に記載のタンパク質またはその断片を測定する免疫学的測定方法。

〔18〕 〔15〕に記載の抗体を含む〔2〕に記載のタンパク質またはその断片の免疫学的測定用試薬。

〔19〕 メグー 1 をコードする遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

〔20〕 非ヒト脊椎動物がマウスである〔19〕に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

〔21〕 メグー 1 をコードする遺伝子の発現が抑制されたノックアウトマウスである〔20〕に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

前記課題を達成するために本発明者は、3' 領域 cDNA ライブラリー (3'-directed cDNA library) を用いた。この方法により、cDNA の大きさを反映するクローニング効率の変動を回避することができる。3' 領域の配列は遺伝子に特有なものであり、約 200~300bp の配列データは、遺伝子の特徴を明らかにするのに充分である (Yasuda, Y., Miyata, T. et al., *Kidney Int*, 1998 Jan, 53:1, 154-8)。

本発明のヒト・メグー 1 をコードするポリヌクレオチドは、メサンギウム細胞から mRNA を調製した後、既知の方法により二本鎖 cDNA に変換することにより得ることができる。mRNA の調製はグアニジンイソチシアネート-塩化セシウム法 [Chirwin, et al. *Biochemistry* 18, 5294 (1979)]、デオキシリボヌクレアーゼ存在下に界面活性剤処理、フェノール処理を行なう方法 [Berger & Birkenmeier, *Biochemistry* 18, 5143 (1979)] などを用いることができる。全 RNA からの poly(A)⁺RNA の調製はオリゴ(dT)を結合した担体 (例えばセファロース、セルロースやラテックス粒子等) を用いたアフィニティークロマトグラフィーなどを用いて行なうことができる。得られた mRNA を鋳型として、3' 端にある poly(A)

鎖に相補的なオリゴ(dT)、ランダムプライマー、あるいはメグー 1 のアミノ酸配列の一部に相応する合成オリゴヌクレオチドをプライマーとして逆転写酵素で処理することによって cDNA(1st strand)を得ることができる。mRNA とそれに相補的な cDNA とで構成されるハイブリッドの mRNA を E. Coli RNase H で部分的に切断し、これをプライマーとして E. Coli DNA polymerase I により cDNA(2nd strand)が合成される。最終的に E. Coli DNA Ligase で処理することにより、二本鎖 cDNA を得ることができる。

ヒト・メグー 1 遺伝子塩基配列をもとに合成したプライマーを用いて、メサンギウム細胞 poly(A)⁺RNA を鋳形にして RT-PCR 法によりクローニングすることも可能である。また、PCR によらず、ヒト・メグー 1 遺伝子塩基配列をもとにプローブを合成し、直接 cDNA ライブラリーをスクリーニングし、目的とする cDNA を得ることもできる。本発明の遺伝子は、これらの方法により得られた遺伝子の中から、その遺伝子の塩基配列を確認することにより、選択することができる。マウスとラット等、ヒト以外の種におけるメグー 1 のホモログについても、同様の手法により cDNA の取得が可能である。

あるいは、メグー 1 のホモログの cDNA を以下のような手法によって単離することも可能である。すなわち、前記ヒト・メグー 1 cDNA の塩基配列をプローブとして用い、cDNA ライブラリーをコロニーハイブリダイゼーションやプラークハイブリダイゼーションによってスクリーニングして、メグー 1 のホモログをコードする cDNA を単離することができる。cDNA ライブラリーは、マウス、ラットの組織や、培養メサンギウム細胞等から抽出した mRNA を鋳型として合成することができる。あるいは、市販 cDNA ライブラリー（フナコシ製等）を用いることもできる。この他に、本発明によるヒト・メグー 1 の cDNA をもとに、ORF の前後にディジェネレーティブプライマーを設計し、これを利用した PCR によってホモログの cDNA を増幅する方法を用いることもできる。実施例にはこのような手法に基づいて取得されたメグー 1 のラットにおけるホモログが開示されている。

ヒト・メグー 1 ゲノムは、ゲノミックライブラリーのスクリーニングによって得ることができる。ゲノミックライブラリーは、たとえばヒト B リンパ芽球からゲノムを調製し、Sau3 で部分的に切断した DNA をファージベクターである EMBL3 に組み込むことにより合成することができる (Blood, vol 83, No 11, 1994: pp 3126-3131)。このようなゲノミックライブラリーについて、プラークハイブリダイゼーション法 (新細胞工学実験プロトコル、秀潤社、pp79-92、参照) を行えば、目的とするゲノムを含むクローンを取得できる。プローブとしては、メグー 1 cDNA の ORF 全ての領域 (2850bp)、または cDNA 部分をプライマーとしてヒトゲノム DNA を PCR 法を用いて増幅することにより得られた各エキソン-イントロン部分を用いることができる。また、同時に調節領域に関しても、ヒト培養メサングウム細胞由来 mRNA、もしくはヒト腎臓 mRNA (Clontech 社より購入) を鋳型として、5' RACE 法 (5'-Full RACE Core Set (宝酒造 (株) の方法に従う)) を用いて 5' UTR の配列決定を行うことができる。

本発明の遺伝子は、例えばホスホアミダイド法 [Mattencchi, M. D. & Caruthers, M. H. J. Am. Chem. Soc. 103, 3185 (1981)]、ホスファイト・トリエステル法 [Hunkapiller, M. et al. Nature 310, 105 (1984)] 等の核酸の化学合成を用いる常法に従って製造することもできる。

なお、一般に、真核生物の遺伝子はヒトインターフェロン遺伝子で知られているように多形現象を示すことが多い。この多形現象によって、アミノ酸配列に 1 個あるいはそれ以上のアミノ酸の置換を生じても、通常タンパク質の活性は維持される。また一般に、1 個または数個のアミノ酸の改変では、タンパク質の活性は維持される場合が多いことが知られている。従って、配列番号：2 に示されるアミノ酸配列をコードする遺伝子を人工的に改変したものをを用いて得られたタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、該タンパク質が本発明の遺伝子の特徴的な機能を有する限り、すべて本発明に含まれる。また、配列番号：2 に示され

るアミノ酸配列を人工的に改変したタンパク質は、本発明のタンパク質の特徴を有する限り、すべて本発明に含まれる。

その他、本発明のタンパク質には、配列番号：2に記載のアミノ酸配列、またはこれらアミノ酸配列において1若しくは複数個のアミノ酸が置換、欠失、付加、および／または挿入されたアミノ酸配列を含み、本発明によるメグー1と機能的に同等なタンパク質が含まれる。なお本発明において機能的に同等とは、メグー1と同等の生物学的特性を持つことを意味する。本発明者は、メグー1にたとえば以下のような生物学的な特性を見出している。

まず、メグー1はそのアミノ酸配列において、ヒトのみならず様々な種属のプロテインフォスファターゼ2A（PP2A）のAユニット（調節ユニット）と20－30%のホモロジーを有する。一方PP2Aでは、AユニットのC末端側にCユニット（酵素活性の有る触媒ユニット）、そしてN末端側にはBユニット（組織や細胞に特異的なもう一つの調節ユニット）とが結合して3量体を形成することが知られている。そしてAユニットやCユニットが組織や細胞の間で共通の構造を持つのに対して、Bユニットは組織や細胞に特異的な構造を持つと考えられている。これらの情報に基づけば、PP2Aとのホモロジーを持つ本発明のメグー1をAユニットとするBユニットは、メサングウム細胞に特異的なタンパク質である可能性が推測される。メグー1をAユニットとするBユニットには、PP2Aとは異なった、メサングウム細胞に特異的な活性制御機構が伴っているものと考えられる。

またメグー1の発現特性は、メサングウム初代培養細胞で特に高度に発現していることが特徴的であった。その他の初代培養細胞では、皮膚繊維芽細胞や腎皮質上皮細胞で発現が観察され、臍帯静脈内皮細胞、平滑筋細胞においてはわずかな発現が観察された。組織間の比較においては、心および胎盤、次いで脳、骨格筋、腎および脾において高度な発現が観察された。その他に肝で弱い発現が観察され、肺での発現は観察されなかった。培養癌細胞株においてはHeLa細胞S3、

慢性骨髄性白血病 K-562、リンパ芽球白血病 MOLT-4、大腸腺癌 SW480、および肺癌 A549 で強い発現が観察され、前骨髄白血病 HL-60、黒色腫 G361 でも発現が見られた。Burkitt リンパ腫 Raji では、ほとんど発現が見られなかった。またラット・メグー 1 のラットにおける発現解析の結果、メグー 1 は、ヒトとラットに共通して腎臓（特にメサングウム細胞）に高発現していることから、メサングウム細胞の機能に関与する機能遺伝子の一つである可能性が考えられる。各組織や培養細胞におけるメグー 1 の発現状態は、たとえば配列番号：1 から選択された塩基配列を持つプローブによって、各組織から調製した mRNA を試料としてノーザンブロットアッセイを行うことによって知ることができる。

以上のような生物学的特性について、機能的に同等なタンパク質は、いずれも本発明によるメグー 1 を構成する。したがって、具体的に構造を明らかにしたヒトのメグー 1 のみならず、構造的にあるいは機能的に同等な他の種のホモログは本発明に含まれる。

ホモロジーサーチによって確認された公知のアミノ酸配列のうち、もっともメグー 1 に近い構造を持ったものは、PP4_{R1} (J. Biol. Chem. 274 (9), 5339-5347, 1999) である。しかし PP4_{R1} は、ウシの小腸から単離されたタンパク質セリン/スレオニンフォスファターゼ 4 調整ユニットのヒト・ホモログとして報告されたタンパク質である。その構造においては、PP4_{R1} の N 末端から 18 位に存在する S が、メグー 1 では FGVDDYSSSESDVIIIPSA の 18 アミノ酸残基となっており、両者は異なった構造を持つタンパク質である。また機能的に見ても、メサングウム細胞に高度に発現するメグー 1 に対して、PP4_{R1} はウシ小腸由来のタンパク質のアミノ酸配列に基づいて単離された神経上皮細胞由来のタンパク質であることから、両者は異なったタンパク質である。両者の間で相違するアミノ酸配列が連続していることから、メグー 1 と PP4_{R1} とは互いに複数の遺伝子にコードされるアイソフォームやスプライシング変異体である可能性が考えられる。

また、本発明のポリヌクレオチドには、これらの機能的に同等なタンパク質をコードするポリヌクレオチドが含まれる。これらのタンパク質をコードするポリヌクレオチドは、cDNA のみならずゲノム DNA や合成 DNA、RNA、更にはヌクレオチド誘導体で構成された人工的なポリヌクレオチド分子であることもできる。

また、所望のアミノ酸に対するコドンはその自体公知であり、その選択も任意でよく、例えば利用する宿主のコドン使用頻度を考慮して常法に従い決定できる [Grantham, R. et al. Nucleic Acids Res. 9, r43 (1981)]。従って、コドンの縮重を考慮して、塩基を適宜改変したものもまた本発明のポリヌクレオチドに含まれる。所望の改変をコードする合成オリゴヌクレオチドからなるプライマーを利用した部位特異的変位導入法 (sitespecific mutagenesis) [Mark, D.F. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81, 5662 (1984)] 等にしがたって、これら塩基配列のコドンの一部改変することができる。

更に、配列番号：1 に記載の塩基配列を含むポリヌクレオチドとハイブリダイズすることができ、かつそのポリヌクレオチドによってコードされるタンパク質が本発明によるメグー 1 に特徴的な機能を有する限り、そのポリヌクレオチドは本発明によるポリヌクレオチドに含まれる。ストリンジェントな条件下で特定配列にハイブリダイズすることができる配列は、特定配列がコードするタンパク質と類似した活性を持つものが多いと考えられる。ストリンジェントな条件とは、一般的には以下のような条件を示すことができる。すなわち、 $4 \times \text{SSC}$ 、 65°C でハイブリダイゼーションさせ、 $0.1 \times \text{SSC}$ を用いて 65°C で 1 時間洗浄する。ストリンジェンシーを大きく左右するハイブリダイゼーションや洗浄の温度条件は、融解温度 (T_m) に応じて調整することができる。 T_m はハイブリダイズする塩基対に占める構成塩基の割合、ハイブリダイゼーション溶液組成 (塩濃度、ホルムアミドやドデシル硫酸ナトリウム濃度) によって変動する。したがって、当業者であればこれらの条件を考慮して同等のストリンジェンシーを与える条件を経験的に設定することができる。

変異体も含め本発明によるポリヌクレオチドの塩基配列は、公知の技術に基づいてさまざまな用途に利用することができる。

このようにしてクローン化されたメグー 1 をコードするポリヌクレオチドは適当な発現ベクター DNA に組み込むことにより、他の原核細胞または真核細胞の宿主を形質転換させることができる。さらに、これらの発現ベクターに適当なプロモーターおよび形質発現に係る配列を導入することにより、それぞれの宿主細胞において遺伝子を発現することが可能である。発現ベクターとしては、例えば大腸菌の場合は、pET-3 [Studier & Moffatt, J. Mol. Biol. 189, 113(1986)] 等が、COS 細胞の場合は pEF-BOS [Nucleic Acids Research 18, 5322 (1990)]、pSV2-gpt [Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 2072 (1981)] 等が、CHO 細胞の場合は pVY1 [国際公開第 89/03874 号公報] 等がそれぞれ挙げられる。また、目的とする遺伝子に他のポリペプチドをコードする遺伝子を連結して融合タンパク質として発現させることにより、精製を容易にし、その後目的タンパク質を切り出すことも可能である。融合させるタンパク質としては、ヒスチジンタグ、c-myc タグ、MBP-タグ、あるいは GST-タグ等が知られている。これらのタグを融合させた状態でインサートを発現させることができるベクターは市販されている。

本発明の発現系に用いる宿主のうち原核生物宿主細胞としては、例えば、大腸菌 (*Escherichia coli*) が挙げられる。また真核生物のうち、真核微生物の宿主細胞としては、例えばサッカロミセス・セレビシエー (*Saccharomyces cerevisiae*) 等が挙げられる。一方哺乳動物由来の宿主細胞としては、例えば COS 細胞、CHO 細胞、BHK 細胞等が挙げられる。なお、本発明の形質転換体の培養は、宿主細胞に適した培養条件を適宜選択して行なえばよい。

以上のようにして目的とするメグー 1 をコードするポリヌクレオチドで形質転換した形質転換体を培養し、産生されたメグー 1 は、細胞内または細胞外から分離し均一なタンパク質にまで精製することができる。なお、本発明の目的タンパ

ク質であるメグー 1 の分離、精製は、通常のタンパク質で用いられる分離、精製方法を使用すればよく、何ら限定されるものではない。例えば各種クロマトグラフィー等を適宜選択し、組み合わせれば、メグー 1 を分離、精製することができる。

なお、上述の他、本発明の遺伝子、該遺伝子を含有する組換えベクター、該ベクターによる形質転換体および該遺伝子を用いたメグー 1 の製造過程における遺伝子操作の処理手段は、「Molecular Cloning-A Laboratory Manual」(Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.) に記載の常法に従って行うことができる。

この他、配列番号：1 に記載の塩基配列に基づいて、メグー 1 遺伝子を検出するためのプローブを設計することができる。あるいは、これらの塩基配列を含む DNA や RNA を増幅するためのプライマーを設計することができる。与えられた塩基配列をもとに、プローブやプライマーを設計することは当業者が日常的に行っていることである。設計された塩基配列を持つオリゴヌクレオチドは化学合成によって得ることができる。そしてそのオリゴヌクレオチドに適当な標識を付加すれば、さまざまなフォーマットのハイブリダイゼーションアッセイに利用することができる。あるいは、PCR のような核酸の合成反応に利用することができる。プローブやプライマーに利用するオリゴヌクレオチドは、少なくとも 15 塩基、好適には 25-50 塩基の長さとするのが望ましい。大部分の塩基配列を共有している PP4_{R1} との間で構造上の違いとなっている 18 アミノ酸残基をコードする領域 (74-127) に相当する部分から選択した塩基配列を含むようにすれば、両者の識別が可能なプローブ (あるいはプライマー) を設計することができる。

本発明は、配列番号：1 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを提供する。ここで「相補鎖」とは、A:T (RNA においては T を U に読みかえる)、G:C の塩基対からなる 2 本鎖ポリヌクレオチドの一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド領域で完

全に相補配列である場合に限られず、少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは 90%、さらに好ましくは 95% 以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。塩基配列の相同性は、本明細書に記載したアルゴリズムにより決定することができる。メグー 1 がメサングウム細胞で高度な発現を示すことから、本発明によるメグー 1 遺伝子を検出するためのプローブやプライマーは、メサングウム細胞の同定や検出に利用することができる。特にプライマーは、メグー 1 遺伝子の増幅においても有用である。本発明によるオリゴヌクレオチドには、必要に応じて標識や結合性のタグを付与することができる。

また本発明は、メグー 1 の発現レベルを指標とする、メサングウム増殖性腎炎の検出方法を提供する。本発明のポリヌクレオチドは、メサングウム増殖性腎炎を発症した腎組織のメサングウム細胞において発現が亢進している。このことは実施例において、抗 Thy1 モノクローナル抗体の投与によってメサングウム増殖性腎炎を誘導されたラットのメサングウム細胞において、ラット・メグー 1 mRNA の強い発現が観察されたことから裏付けられている。したがって、生体試料中のメグー 1 の発現レベルを測定し、正常な状態にある生体試料の測定結果と比較して発現が亢進している場合に、メサングウム増殖性腎炎を検出することができる。生体試料としては、メサングウム細胞や、尿、血液などを用いることができる。メグー 1 の発現レベルは、mRNA や、その翻訳生成物であるメグー 1 蛋白質、あるいはそれらの断片を測定することにより比較することができる。生体試料中の、これらの成分を測定する方法は公知である。たとえば、メグー 1 mRNA はノーザンブロット法や RT-PCR 法によって検出、あるいは測定することができる。またメグー 1 蛋白質やその断片は、メグー 1 を認識する抗体によって検出することができる。メサングウム細胞を生体試料とする場合には、*in situ* ハイブリダイゼーションや、免疫組織学的な検出方法を利用することにより、細胞内でのこれらの成分の局在を明らかにすることもできる。

更に本発明が明らかにしたメグー 1 をコードする遺伝子の塩基配列に基づいて、メグー 1 の発現を制御するアンチセンスポリヌクレオチドが提供される。本発明によるアンチセンスポリヌクレオチドは、メグー 1 のメサングウム細胞における役割を明らかにするための重要なツールとなる。あるいはメグー 1 の発現亢進によってもたらされる病態の制御に有用である。アンチセンスポリヌクレオチドが標的遺伝子の発現を抑制する作用としては、以下のような複数の要因が存在する。すなわち、三重鎖形成による転写開始阻害、RNA ポリメラーゼによって局所的に開状ループ構造がつけられた部位とのハイブリッド形成による転写抑制、合成の進みつつある RNA とのハイブリッド形成による転写阻害、イントロンとエキソンとの接合点でのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、スプライソソーム形成部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、mRNA とのハイブリッド形成による核から細胞質への移行抑制、キャッピング部位やポリ(A)付加部位とのハイブリッド形成によるスプライシング抑制、翻訳開始因子結合部位とのハイブリッド形成による翻訳開始抑制、開始コドン近傍のリボソーム結合部位とのハイブリッド形成による翻訳抑制、mRNA の翻訳領域やポリソーム結合部位とのハイブリッド形成によるタンパク質鎖に伸長阻止、および核酸とタンパク質との相互作用部位とのハイブリッド形成による遺伝子発現抑制、などである。これらは、転写、スプライシング、または翻訳の過程を阻害して、標的遺伝子の発現を抑制する(平島および井上「新生化学実験講座 2 核酸 I V 遺伝子の複製と発現」, 日本生化学会編, 東京化学同人, pp. 319-347, 1993)。

本発明で用いられるアンチセンス配列は、上記のいずれの作用で標的遺伝子の発現を抑制してもよい。一つの態様としては、遺伝子の mRNA の 5' 端近傍の非翻訳領域に相補的なアンチセンス配列を設計すれば、遺伝子の翻訳阻害に効果的であろう。しかし、コード領域もしくは 3' 側の非翻訳領域に相補的な配列も使用し得る。このように、遺伝子の翻訳領域だけでなく非翻訳領域の配列のアンチセンス配列を含むポリヌクレオチドも、本発明で利用されるアンチセンスポリヌク

レオチドに含まれる。使用されるアンチセンスポリヌクレオチドは、適当なプロモーターの下流に連結され、好ましくは 3' 側に転写終結シグナルを含む配列が連結される。このようにして調製された DNA は、公知の方法で、所望の宿主へ形質転換できる。アンチセンスポリヌクレオチドの配列は、形質転換する宿主が持つ内在性遺伝子（あるいはその相同遺伝子）、またはその一部と相補的な配列であることが好ましいが、遺伝子の発現を有効に阻害できる限り、完全に相補的でなくてもよい。

アンチセンスポリヌクレオチドを鋳型として転写された RNA が、標的遺伝子の転写産物に対して好ましくは 90%、最も好ましくは 95%の相補性を有するように設計する。アンチセンス配列を用いて、効果的に標的遺伝子の発現を阻害するには、アンチセンスポリヌクレオチドの長さは、少なくとも 15 塩基以上であり、好ましくは 100 塩基以上であり、さらに好ましくは 500 塩基以上である。通常、用いられるアンチセンス RNA の長さは 2.5kb よりも短い。

更に本発明が提供するメグー 1 の cDNA 塩基配列に基づいて、ゲノム中に存在するメグー 1 遺伝子のプロモーター領域、エンハンサー領域を取得することができる。具体的には、特開平 6-181767 号公報、「The Journal of Immunology(1995)155,2477-2486, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1995), 92, 3561-3565」等と同様の方法でこれらの制御領域の取得が可能である。なお、本明細書において、プロモーター領域とは転写開始部位の上流に存在する遺伝子の発現を制御する DNA 領域を、エンハンサー領域とはイントロンまたは 3' UTR に存在する遺伝子の発現を制御する DNA 領域をいう。

具体的には、プロモーター領域は、例えば、以下の方法によって取得することができる。

1) メグー 1 の cDNA の 5' 末端側をプローブとし、ヒトゲノムライブラリーよりメグー 1 のプロモーター領域をクローニングする。

2) 制限酵素消化してメグー 1 遺伝子の翻訳開始コドンを含むその上流部分 (2 ~ 5 kbp) のプロモーター領域を含む DNA を得、塩基配列を決定する。ヒトメサンギウム細胞から調製した poly(A)⁺RNA を鋳型とし、メグー 1 遺伝子の 5' 末端側 cDNA 配列より選択したプライマーDNA を用いたプライマー伸長法により、転写開始点 (+1) を決定する。塩基配列から転写因子結合配列を検索し、プロモーター活性を有する可能性がある箇所を予想する。

3) 2) で得た DNA からメグー 1 遺伝子のコード領域を除いた DNA 断片をプラスミド上にサブクローニングし、この DNA 断片の 2 ~ 5 kbp 下流に、レポーター遺伝子としてのクロラムフェニコールアセチル転位酵素 (CAT) 遺伝子、あるいは、ルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータープラスミドを構築する。同様に、プロモーター領域の可能性がある各箇所を含むような形で、制限酵素消化により、或いは、PCRにより、5' 末端側及び 3' 末端側を順次削ったメグー 1 遺伝子上流部分の様々な部位に該当する DNA 断片を作成し、これらの下流に、レポーター遺伝子としての CAT 遺伝子、あるいは、ルシフェラーゼ遺伝子を連結したレポータープラスミドを構築する。

4) 3) で作製したレポータープラスミドで形質転換した動物細胞の CAT 或いはルシフェラーゼ活性を測定することにより、メグー 1 遺伝子上流部分に存在するプロモーター領域を得る。

また、3' UTR、イントロン中のエンハンサー領域は、メグー 1 cDNA をプローブとし、ヒトゲノムライブラリーよりヒト・メグー 1 のゲノム遺伝子をクローニングし、上述のプロモーターに関する方法と同様にして、エンハンサー活性を有する領域を得ることができる。

メグー 1 遺伝子の発現を制御している転写因子は、「新細胞工学実験プロトコール (秀潤社)」、「バイオマニュアルシリーズ 5 転写因子研究法 (羊土社)」、「DNA & Cell Biology, 13, 731-742 (1994)」に記載の方法等の公知の方法、例えば、アフィニティーカラムを用いた方法、サウスウエスタン法、フットプリン

ティング法、ゲルシフト法、または one-hybrid 法で得ることができる。なお、本明細書において、転写因子とはメグー 1 遺伝子の転写を調節している因子で、転写の開始反応を誘導する転写開始因子と、転写を正または負に調節する転写調節因子をさす。

アフィニティーカラム法を用いる場合は、前述の方法で得た、プロモーター領域、エンハンサー領域をセファロース或いはラテックスビーズに固定化したカラムに、核抽出液をかけ、カラムを洗浄後、カラムに固定化した配列と同様の配列を有する DNA を用い、結合した転写因子を溶出することによって、メグー 1 遺伝子の発現を制御している転写因子を得ることができる。

また、サウスウエスタン法を用いる場合は、大腸菌の発現ベクター（例えば *gt11*）に挿入した cDNA の発現産物を標識プローブによってスクリーニングする。たとえばスクリーニングすべき cDNA を β -ガラクトシダーゼとの融合タンパク質として発現させ、これをニトロセルロース膜に吸着させる。次いで放射性同位元素で標識されたプロモーター領域やエンハンサー領域の DNA 断片をプローブにし、結合活性をもつ融合タンパク質を合成するファージを選択することによって、メグー 1 遺伝子の発現を制御している転写因子を得ることができる。

ゲルシフト法は、遊離の DNA がタンパク質と結合したときにポリアクリルアミドゲルによる電気泳動の移動度に差を生じる現象に基づいている。プロモーター領域やエンハンサー領域の DNA 断片をプローブとし、転写因子が含まれる試料（たとえば核タンパク質抽出液）と混合して、低イオン強度の元で電気泳動分析する。転写因子の結合は、遊離の DNA とは違った移動度のバンドとして検出される。ゲルシフト法は、タンパク質の混合物から高い感度で転写因子を分離することができる。

ゲルシフト法によって得られた DNA と転写因子の複合体を、更にフットプリント法によって解析すると、転写因子の結合部位を決定することができる。フットプリント法は、DNA 上にタンパク質が結合すると DNase I の消化から保護される

現象を利用している。すなわち、末端を ^{32}P で標識したプロモーター領域やエンハンサー領域の DNA を、転写因子の共存化で DNase I によって部分消化し、これを塩基配列決定用の変性ポリアクリルアミドゲルで分離する。転写因子の無い状態で同様の処理を行った結果と比較すると、転写因子の結合によってバンドの消失が観察されることから、その結合部位の推定が可能となる。

本発明はまた、メグー 1 を認識する抗体を提供する。本発明の抗体には、例えば、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質に対する抗体が含まれる。メグー 1 または本発明のメグー 1 の部分ペプチドに対する抗体（例えばポリクローナル抗体、モノクローナル抗体）または抗血清は、本発明のメグー 1、本発明のメグー 1 の部分ペプチド、あるいは本発明による c-myc-(His)₆-Tag-メグー 1 や MBP-メグー 1 のような融合タンパク質を抗原として用い、公知の抗体または抗血清の製造法に従って製造することができる。

本発明のメグー 1、または本発明のメグー 1 の部分ペプチドは、温血動物に対して投与による抗体産生が可能な部位に、公知の担体や希釈剤と共に投与される。投与に際して抗体産生能を高めるため、完全フロイントアジュバントや不完全フロイントアジュバントを投与してもよい。投与は通常 1~6 週毎に 1 回ずつ、計 2~10 回程度行われる。抗体産生に用いられる温血動物としては、例えばサル、ウサギ、イヌ、モルモット、マウス、ラット、ヒツジ、ヤギ、あるいはニワトリ等が挙げられるが、マウスおよびウサギが好ましく用いられる。

モノクローナル抗体産生細胞の作製に際しては、抗原を免疫された温血動物、例えばマウスから抗体価の認められた個体を選択し最終免疫の 2~5 日後に脾臓またはリンパ節を採取し、それらに含まれる抗体産生細胞を骨髓腫細胞と融合させることにより、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを調製することができる。抗血清中の抗体価の測定は、例えば後記の標識化メグー 1 と抗血清とを反応させた後、抗体に結合した標識剤の活性を測定することによりなされる。融合操作は既知の方法、例えばケーラーとミルスタインの方法 (Nature, 256, 495 (19

75)) に従い実施できる。融合促進剤としてはポリエチレングリコール (PEG) やセンダイウイルスなどが挙げられるが、好ましくは PEG が用いられる。

骨髓腫細胞としては例えば X-63Ag8、NS-1、P3U1、SP2/0、AP-1 などが挙げられるが、X-63Ag8 が好ましく用いられる。用いられる抗体産生細胞 (脾臓細胞) 数と骨髓腫細胞数との好ましい比率は 1 : 20 ~ 20 : 1 であり、PEG (好ましくは PEG1000 ~ PEG6000) が 10 ~ 80% 程度の濃度で添加され、20 ~ 40℃、好ましくは 30 ~ 37℃ で 1 ~ 10 分間インキュベートすることにより効率よく細胞融合を実施できる。抗メグー 1 抗体産生ハイブリドーマのスクリーニングには種々の方法が使用できるが、例えばメグー 1 抗原を直接又は担体と共に吸着させた固相 (例えば、マイクロプレート) にハイブリドーマ培養上清を添加し、次に放射性物質や酵素などで標識した抗免疫グロブリン抗体 (細胞融合に用いられる細胞がマウスの場合、抗マウス免疫グロブリン抗体) が用いられる。またはプロテイン A を加え、固相に結合した抗メグー 1 モノクローナル抗体を検出する方法、抗免疫グロブリン抗体又はプロテイン A を吸着させた固相にハイブリドーマ培養上清を添加し、放射性物質や酵素などで標識したメグー 1 を加え、固相に結合した抗メグー 1 モノクローナル抗体を検出する方法などが挙げられる。

抗メグー 1 モノクローナル抗体の選別およびクローニングは、自体公知またはそれに準じる方法に従って行うことができる。通常 HAT (ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン) を添加した動物細胞用培地で行われる。選別、クローニングおよび育種用培地としては、ハイブリドーマが生育できるものならばどのような培地を用いてもよい。例えば、1 ~ 20%、好ましくは 10 ~ 20% の牛胎児血清を含む RPMI1640 培地 (大日本製薬 (株))、1 ~ 10% の牛胎児血清を含む GIT 培地 (和光純薬工業 (株))、またはハイブリドーマ培養用無血清培地 (SFM-101、日水製薬 (株)) などを用いることができる。培養温度は、通常 20 ~ 40℃、好ましくは約 37℃ である。培養時間は、通常 5 日 ~ 3 週間、好ましくは 1 週間 ~ 2 週間である。培養は、通常 5% 炭酸ガス下で行われる。ハイブリドーマ培養上清

の抗体価は、上記の抗血清中の抗メグー 1 抗体価の測定と同様にして測定できる。クローニングは、通常半固体アッガー法や限界希釈法などのそれ自体公知の方法で行うことができ、クローン化されたハイブリドーマは、好ましくは無血清培地中で培養され、至適量の抗体をその上清に与える。目的のモノクローナル抗体は腹水化して得ることもできる。

本発明によるモノクローナル抗体は、メグー 1 に特異的なエピトープを認識するものを選択することによって他のタンパク質と交差しないものとすることができる。一般的に、そのタンパク質を構成するアミノ酸配列の中から、連続する少なくとも 7 以上のアミノ酸残基、望ましくは 10-20 アミノ酸のアミノ酸配列によって提示されるエピトープは、そのタンパク質に固有のエピトープを示すといわれている。したがって、配列番号：2 に記載されたアミノ酸配列から選択され、かつ連続する少なくとも 7 アミノ酸残基からなるアミノ酸配列を持つペプチドによって構成されるエピトープを認識するモノクローナル抗体は、本発明におけるメグー 1 特異的なモノクローナル抗体といえる。より具体的には、たとえば前記 PP4_{R1} との構造上の違いをもたらしている 18 アミノ酸残基（N 末端から 18 - 35 位）からなる領域を認識し、たとえば PP4_{R1} のような相同性の高いタンパク質との構造的な違いを識別する抗体は、本発明によるメグー 1 を認識する抗体の望ましい態様と言う事ができる。

抗メグー 1 モノクローナル抗体の分離精製は通常のポリクローナル抗体の分離精製と同様に免疫グロブリンの分離精製法に従って行われる。公知の精製法としては、例えば、塩析法、アルコール沈殿法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換体（例えば DEAE）による吸脱着法、超遠心法、ゲル濾過法、抗原結合固相またはプロテイン A またはプロテイン G などの活性吸着剤により抗体のみを採取し、結合を解離させて抗体を得る特異的精製法のような手法を示すことができる。

このようにして得られたメグー 1 を認識する本発明によるモノクローナル抗体、あるいはポリクローナル抗体は、メサンギウム細胞に関連する疾病の診断や治療

に利用することが可能である。またメグー 1 がメサンギウム細胞に高度に発現しているタンパク質であることから、メサンギウム細胞の同定や検出のためのツールとしても、これらの抗体を利用することができる。細胞が持つタンパク質を免疫学的に検出する方法は公知である。またこれらの抗体を用いてメグー 1 を測定する方法としては、不溶性担体に結合させた抗体と標識化抗体とによりメグー 1 を反応させて生成したサンドイッチ錯体を検出するサンドイッチ法、また、標識ヒト・メグー 1 と検体中のヒト由来メグー 1 を抗体と競合的に反応させ、抗体と反応した標識抗原量から検体中のヒト由来メグー 1 を測定する競合法等を示すことができる。

サンドイッチ法によるメグー 1 の測定においては、まず、固定化抗体とメグー 1 とを反応させた後、未反応物を洗浄によって完全に除去し、標識化抗体を添加して固定化抗体ーメグー 1 標識化抗体を形成させる 2 ステップ法、もしくは固定化抗体、標識化抗体およびメグー 1 を同時に混合する 1 ステップ法などを用いることができる。

測定に使用される不溶性担体は、例えばポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリエステル、ポリアクリル酸エステル、ナイロン、ポリアセタール、フッ素樹脂等の合成樹脂、セルロース、アガロース等の多糖類、ガラス、金属などが挙げられる。不溶性担体の形状としては、例えばトレイ状、球状、粒子状、繊維状、棒状、盤状、容器状、セル、試験管等の種々の形状を用いることができる。抗体を吸着した担体は、適宜アジ化ナトリウム等の防腐剤の存在下、冷所に保存する。

抗体の固相化は、公知の化学結合法又は物理的吸着法を用いることができる。化学的結合法としては例えばグルタルアルデヒドを用いる方法、N-スクシニイミジル-4- (N-マレイミドメチル) シクロヘキサン-1-カルボキシレート及びN-スクシニイミジル-2-マレイミドアセテートなどを用いるマレイミド法、1-エチル-3- (3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミド塩酸などを用いるカルボジイミ

ド法が挙げられる。その他、マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシニミドエステル法、N-サクシミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオン酸法、ビスジアゾ化ベンジジン法、ジパルミチルリジン法が挙げられる。あるいは、先に被検出物質とエピトープの異なる2種類の抗体を反応させて形成させた複合体を、抗体に対する第3の抗体を上記の方法で固相化させておいて捕捉することも可能である。

標識物質は、免疫学的測定法に使用することができるものであれば特に限定されない。具体的には、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性物質、金属キレート等を使用することができる。好ましい標識酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、 β -D-ガラクトシダーゼ、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ、ブドウ球菌ヌクレアーゼ、デルタ-5-ステロイドイソメラーゼ、 α -グリセロールホスフェートデヒドロゲナーゼ、トリオースホスフェートイソメラーゼ、西洋わさびパーオキシダーゼ、アスパラギナーゼ、グルコースオキシダーゼ、リボヌクレアーゼ、ウレアーゼ、カタラーゼ、グルコース-6-ホスフェートデヒドロゲナーゼ、グルコアミラーゼ、およびアセチルコリンエステラーゼ等が挙げられる。好ましい蛍光物質としては、例えばフルオレセインイソチアネート、フィコビリプロテイン、ローダミン、フィコエリトリン、フィコシアニン、アロフィコシアニン、およびオルトフタルアルデヒド等が挙げられる。好ましい発光物質としてはイソルミノール、ルシゲニン、ルミノール、芳香族アクリジニウムエステル、イミダゾール、アクリジニウム塩及びその修飾エステル、ルシフェリン、ルシフェラーゼ、およびエクオリン等が挙げられる。そして好ましい放射性物質としては、 ^{125}I 、 ^{127}I 、 ^{131}I 、 ^{14}C 、 ^3H 、 ^{32}P 、あるいは ^{35}S 等が挙げられる。

前記標識物質を抗体に結合する手法は公知である。具体的には、直接標識と間接標識が利用できる。直接標識としては、架橋剤によって抗体、あるいは抗体断片と標識とを化学的に共有結合する方法が一般的である。架橋剤としては、N,N'-オルトフェニレンジマレイミド、4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン

酸・N-スクシンイミドエステル、6-マレイミドヘキサン酸・N-スクシンイミドエステル、4,4'-ジチオピリジン、その他公知の架橋剤を利用することができる。これらの架橋剤と酵素および抗体との反応は、それぞれの架橋剤の性質に応じて既知の方法に従って行えばよい。この他、抗体にビオチン、ジニトロフェニル、ピリドキサル又はフルオレサミンのような低分子ハプテンを結合させておき、これを認識する結合成分によって間接的に標識する方法を採用することもできる。ビオチンに対してはアビジンやストレプトアビジンが認識リガンドとして利用される。一方、ジニトロフェニル、ピリドキサル又はフルオレサミンについては、これらのハプテンを認識する抗体が標識される。抗体を標識する場合、西洋わさびペルオキシダーゼを標識化酵素として用いることができる。本酵素は多くの基質と反応することができ、過ヨウ素酸法によって容易に抗体に結合させることができるので有利である。また、抗体としては場合によっては、そのフラグメント、例えば Fab'、Fab、F(ab')₂ を用いる。また、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体にかかわらず同様の処理により酵素標識体を得ることができる。上記架橋剤を用いて得られる酵素標識体はアフィニティークロマトグラフィー等の公知の方法にて精製すれば更に感度の高い免疫測定系が可能となる。精製した酵素標識化抗体は、防腐剤としてチメロサル(Thimerosal)等を、そして安定剤としてグリセリン等を加えて保存する。標識抗体は、凍結乾燥して冷暗所に保存することにより、より長期にわたって保存することができる。

標識化剤が酵素である場合には、その活性を測定するために基質、必要により発色剤が用いられる。酵素としてペルオキシダーゼを用いる場合には、基質溶液として H₂O₂ を用い、発色剤として 2,2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンズチアゾリンスルホン酸]アンモニウム塩 (ABTS)、5-アミノサリチル酸、オルトフェニレンジアミン、4-アミノアンチピリン、3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン等を使用することができる。酵素にアルカリフォスファターゼを用いる場合は、基質としてオルトニトロフェニルフォスフェート、パラニトロフェニルリン酸等を使用す

ることができる。酵素に β -D-ガラクトシダーゼを用いる場合は基質としてフルオレセイン-ジ- (β -D-ガラクトピラノシド)、4-メチルウンベリフェニル- β -D-ガラクトピラノシド等を使用することができる。本発明は、また、前述のモノクローナル抗体、あるいはポリクローナル抗体を標識して、あるいは固相化してメグー 1 の免疫学的測定用試薬としたもの、更にはこの試薬に標識検出用の指示薬や対照試料等をキット化したものをも含むものである。

本発明におけるメグー 1 の測定対象は、血漿、血清、血液、尿、組織液、あるいは脳脊髄液等の体液等、メグー 1、あるいはメグー 1 の前駆体や断片を含む生体試料であれば限定されない。

加えて本発明は、メグー 1 遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物に関する。ここでメグー 1 遺伝子とは、メグー 1 をコードする cDNA、ゲノム DNA あるいは合成 DNA を含む。また、遺伝子の発現には、転写と翻訳のいずれのステップも含まれる。本発明によるトランスジェニック動物は、メグー 1 の機能あるいは発現調節の研究、ヒトのメサングウム細胞に関連する疾患のメカニズムの解明、医薬品のスクリーニング・安全性に用いる疾患モデル動物の開発に有用である。

本発明においては、メグー 1 遺伝子の発現を正常に調節しているいくつかの重要な部位（エンハンサー、プロモーター、イントロン等）の一部に欠失、置換、挿入などの変異を起こさせることにより、本来の遺伝子の発現レベルと比較して人工的に上昇または下降するように修飾することができる。このような修飾は、メグー 1 遺伝子の転写の調節である。一方、エキソンの一部を欠損させたり、翻訳領域への点突然変異の導入により終止コドンへ置換することにより、タンパク質への翻訳を修飾することもできる。この変異の導入は、公知の方法により行うことができ、トランスジェニック動物を得ることができる。

トランスジェニック動物とは狭義には遺伝子組換えにより、外来遺伝子が生殖細胞に人為的に導入された動物のことをいい、広義にはアンチセンス RNA を用い

て特定の遺伝子の機能を抑えたアンチセンス・トランスジェニック動物や、胚性幹細胞（ES 細胞）を用いて特定の遺伝子をノックアウトさせた動物、点突然変異 DNA を導入した動物を含み、個体発生の初期に外来遺伝子が安定して染色体に導入され、その子孫に遺伝形質として伝達され得る動物のことをいう。本明細書中でいうトランスジェニック動物とはヒト以外のすべての脊椎動物を含む。

トランスジェニック動物の作製方法は、遺伝子と卵を混合させてリン酸カルシウムで処理する方法や、位相差顕微鏡下で前核期卵の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第 4873191 号）、胚性幹細胞（ES 細胞）を使用する方法などがある。その他、レトロウィルスベクターに遺伝子を挿入し、卵に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵に導入する精子ベクター法等が開発されている。精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である（M. Lavitrano et al. *Cell*, 57, 717, 1989）。

あるいはバクテリオファージ P1 の cre/loxP リコンビナーゼ系や *Saccharomyces cerevisiae* の FLP リコンビナーゼ系等の *in vivo* において部位特異的遺伝子組み換えを用いることもできる。また、レトロウィルスを使用して、非ヒト動物へ目的タンパク質のトランスジーンを導入する方法も報告されている。

マイクロインジェクション法によるトランスジェニック動物作製方法は、例えば以下に示すようにして行われる。まず、発現制御に関わるプロモーター、特定のタンパク質をコードする遺伝子、ポリ A シグナルから基本的に構成されるトランスジーンが必要である。プロモーター活性により特定分子の発現様式や発現量が左右され、また、導入トランスジーンのコピー数や染色体上の導入部位により作製されたトランスジェニック動物は系統間で異なるため、各系統間で発現様式・発現量を確認する。非翻訳領域やスプライシングにより発現量が変化することが判明しているため、予めポリ A シグナルの前にスプライシングされるイント

ロン配列を導入してもよい。受精卵に導入する遺伝子はできるだけ純度の高いものを使用することが重要である。使用する動物としては、受精卵採取用マウス（5～6 週齢）、交配用雄マウス、偽妊娠雌マウス、輸精管結紮雄マウス等が用いられる。

効率よく受精卵を得るために、ゴナドトロピン等により排卵を誘発してもよい。受精卵を回収し、マイクロインジェクション法にて卵の雄性前核にインジェクションピペット中の遺伝子を注入する。注入した卵を輸卵管に戻すための動物（偽妊娠雌マウス等）を用意し、一匹に対して約 10～15 個を移植する。その後、誕生したマウスにトランスジーンが導入されているか否か、尾の先端部からゲノム DNA を抽出し、サザン法あるいは PCR 法によりトランスジーンを検出するか、あるいは相同組み換えが起こったときのみに活性化するマーカー遺伝子を挿入したポジティブクローニング法により選択することができる。さらに、トランスジーンの発現を確認するため、ノザン法もしくは RT-PCR 法によりトランスジーン由来転写産物を検出する。または、タンパク質に対する特異的抗体によって、ウェスタンブロッティング法による検出も可能である。

本発明のノックアウトマウスは、マウスメグー 1 遺伝子の機能が失われるように処理されたものである。ノックアウトマウスとは相同組換え技術で任意の遺伝子を破壊し、機能を欠損させたトランスジェニックマウスをいう。胚性幹細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノックアウトマウスを作製することができる。例えば、受精卵の胚盤胞や 8 細胞期胚に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラマウスを得る。このキメラマウス（キメラとは、2 個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう）と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体マウスを作製することができる。さらに、ヘテロ接合体マウス同士を交配することで、ホ

モ接合体マウスが作製できる。本発明によるトランスジェニック動物は、これらヘテロ接合体と、ホモ接合体のいずれをも含むものである。

相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している2つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別にはPCRを使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をプライマーとして使ったPCR反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明する。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

図面の簡単な説明

図1は、正常ヒト糸球体組織の、メグー1特異的なプローブによるインサイチュハイブリダイゼーションの結果を示す顕微鏡写真（40倍）である。

図2は、正常ヒト糸球体組織の、メグー1特異的なプローブによるインサイチュハイブリダイゼーションの結果を、図1の場合と比較して、より高倍率で示す顕微鏡写真（80倍）である。

図3は、抗Thy1抗体によりメサングウム増殖性腎炎を誘発したラットの糸球体から調製した全RNAの泳動結果を示す写真（図中、「total RNA」で示す）、およびそれらのメグー1特異的なプローブによるノーザンブロット解析の結果を示す写真（図中、「rat Meg-1」で示す）である。

発明を実施するための最良の形態

以下本発明を実施例として更に具体的に説明するが、本発明は該実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1〕 ヒトメサングウム細胞の初代培養

58 才の男性から摘出した正常なヒト腎臓から、ヒト糸球体腎臓メサングウム細胞を単離した。腎皮質を、無菌条件下で分離し、細分化し、いくつかの篩を通過させた。用いる篩は、段階的に孔径を小さくしていった。75~200 μm の孔径の篩に捕捉された糸球体を、洗浄し、100 $\mu\text{g/mL}$ のコラゲナーゼ (Washington Biochemical 社製) と共に 37℃ で 20 分間インキュベートした。洗浄後、糸球体を、25mM HEPES、10% Nu-serum (Collaborative Biomedical Products 社, Bedford, MA) および抗生物質 (10 $\mu\text{g/mL}$ のペニシリン、ストレプトマイシン、およびファンギゾン) を含む培地 199 (Gibco BRL 社, Gaithersburg, MD) に再懸濁させ、5%CO₂ インキュベーター内でインキュベートした。3 継代目に、メサングウム細胞を、典型的な形態学的特徴、トリプシン、ピューロマイシンおよび D-バリンに対する耐性、アクチン (Zymed Laboratories 社, San Francisco, CA)、抗 VL A (very late antigen)-1,3,5 (Immunotech) の免疫染色に対して陽性を示すこと、ならびに第 VIII 因子 (Dako 社, CA) の免疫染色に陰性を示すことなどの一連の基準により同定した。

〔実施例 2〕 ヒト培養メサングウム細胞からの mRNA の単離

6 継代目に、グアニジンイソチオシアネート (GTC) 法を用いて、全 RNA をヒトメサングウム細胞から単離した。即ち、実施例 1 の細胞の血清を含む培養液中のメサングウム細胞コンフルエント培養物をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄し、5.5mM GTC 溶液中で溶解させた。DNA は 18 ゲージの針を通過させることにより除去した。核およびその他の細胞破片は 5,000×g で 90 秒間遠心分離することにより沈殿させた。上清をセシウムトリフルオロアセテート (CsTFA) 層に注意深く載せ、15℃、125,000×g で 24 時間遠心分離した。RNA ペレットを TE バッファーに溶解させた。オリゴ dT セルロースカラム (ファルマシア社) により、poly(A)⁺RNA を分離した。

〔実施例 3〕 3' 領域 cDNA ライブラリーの構築

poly(A)⁺RNA を鋳型として、pUC19 を基礎とするベクタープライマー [Norrande r J., et al., Gene, 26, 101-106 (1983)] を用いた cDNA 合成を行った。このベクタープライマーDNA は、HincII 末端、および T テールをもつ PstI 末端を有し、MboI 部位 (GATC) でダム・メチル化 (dam-methylated) されていた。第 2 鎖の合成の後、cDNA 配列、およびベクターの lacZ 遺伝子内の単一 BamHI 部位を、それぞれ MboI および BamHI で切断し、次に、低 DNA 濃度で環状化およびライゲーションを行った。ライゲーション混合物のうちの一部を大腸菌に形質転換した。得られた形質転換体をランダムに選択し、簡単に加熱することにより個別に溶解させた。cDNA 挿入配列を、pUC19 クローニングサイトに隣接するプライマー (5'-TGT AAAACGACGGCCAGT-3' / 配列番号 : 3 および 5'-ACCATGATTACGCCAAGCTTG-3' / 配列番号 : 4) を用いたペアード PCR により増幅させた。得られた短い二本鎖 DNA を、サイクル配列決定反応に用い、自動配列決定機で解析した。

[実施例 4] メサングウム細胞で特異的に発現している遺伝子の単離

メサングウム細胞で特異的に発現している遺伝子を同定するため、本発明者は、大規模な DNA 配列決定およびコンピュータによるデータ処理を行った。このことにより、様々な異なる細胞および臓器における転写産物を同時に比較することができた (Y. Yasuda et al., Kidney International 53:154-158, 1998; K. Matsubara et al., Gene. 135, 265 (1993); K. Okubo et al., Nat. Gen. 2, 173 (1992))。ヒト培養メサングウム細胞の 3' 領域 cDNA ライブラリーの大規模 DNA 配列決定を行い、ランダムに選択した 1836 個のクローンの部分配列を決定した。クローンの配列相同性を、相互に比較し、さらに FASTA プログラムを用いて DNA データバンク GenBank と比較した。様々な臓器および細胞からの mRNA をドットプロット解析することにより、メサングウム細胞で特異的に発現しているクローンが選択された。その結果、本発明者のメサングウム細胞 cDNA ライブラリーにおいてきわめて高い頻度で検出されるいくつかのクローンが得られた。

[実施例 5] 5' RACE 法による完全長 cDNA のクローニング

「5'-Full RACE Core Set」 (宝酒造 (株) 製) を用いて、下記の実験を行った。0.5mL マイクロチューブにヒト培養メサンギウム細胞から調製した poly(A)⁺ RNA (0.5 μ g/ μ L) 4.0 μ L、10 \times RT バッファー 1.5 μ L、RNase インヒビター (40 U/ μ L) 0.5 μ L、AMV Reverse Transcriptase XL (5U/ μ L) 1 μ L、5' 末端リン酸化 RT プライマー (5' - pTCAGAGAGGTCATTC/配列番号: 5、200pmol/ μ L) 1 μ L を加え、RNase Free dH₂O 7 μ L で全量を 15 μ L とした。この反応液を「Takara PCR Thermal Cycler」 (宝酒造 (株) 製) にセットし、30 $^{\circ}$ C 10 分、50 $^{\circ}$ C 60 分、80 $^{\circ}$ C 2 分、4 $^{\circ}$ C 10 分インキュベーションし、第 1 鎖 cDNA を得た。

反応液から 15 μ L を 5 \times ハイブリッド RNA 変性バッファー 15 μ L、H₂O 45 μ L を含む 0.5mL マイクロチューブ中に加えた。RNaseH 1 μ L を加え、30 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。反応終了後、エタノール 150 μ L を加え - 70 $^{\circ}$ C で 30 分冷却後、遠心し、上清を除去し、沈殿物を集めた。

得られた沈殿物に 5 \times RNA (ssDNA) ライゲーションバッファー 8 μ L、40% PEG #600 20 μ L、H₂O 12 μ L を加え、よく混ぜ、T4 リガーゼを 1 μ L 加えて 16 $^{\circ}$ C で 15 時間反応し、環化一本鎖 cDNA を得た。

得られた環化一本鎖 cDNA を TE バッファーで 10 倍希釈したものを鋳型とし、一次 PCR をおこなった。反応条件は、10 \times LA PCR バッファー II (Mg²⁺plus) 5 μ L、dNTP 混合物 (2.5mM) 8 μ L、一次 PCR S1 プライマー (5'-TCATTGATGGGTCCTCAA/配列番号: 6、20pmol/ μ L) 0.5 μ L、一次 PCR A1 プライマー (5'-AGATTCTTGAGCTCAGAT/配列番号: 7、20pmol/ μ L) 0.5 μ L、TaKaRa LA TaqTM (5U/ μ L) 0.5 μ L、滅菌水で全量を 50 μ L とした。「Takara PCR Thermal Cycler」にセットし、94 $^{\circ}$ C 3 分加熱後、94 $^{\circ}$ C 30 秒、60 $^{\circ}$ C 30 秒、72 $^{\circ}$ C 2 分を 25 サイクル反応させた。

一次 PCR 反応溶液から 1 μ L を鋳型とし、10 \times LA PCR TM バッファー II (Mg²⁺plus) 5 μ L、dNTP 混合物 (2.5mM) 8 μ L、二次 PCR S2 プライマー (5'-AATGGTGGCA TAAACATG/配列番号: 8、20pmol/ μ L) 0.5 μ L、二次 PCR A2 プライマー (5'-ACAGACAAATTGAACTTC/配列番号: 9、20pmol/ μ L) 0.5 μ L、TaKaRa LA TaqTM (5U/ μ

L) 0.5 μ L、滅菌水で全量を 50 μ L とした。「Takara PCR Thermal Cycler」にセットし、94℃30 秒、60℃30 秒、72℃2 分で 30 サイクル反応させた。

0.75%アガロースゲル電気泳動法でバンドが得られていることを確認し、反応溶液中から 1 μ L を「Original TA Cloning Kit」(Invitrogen 社)を用いてサブクローニングし、得られたプラスミドに挿入された遺伝子断片の塩基配列をジデオキシターミネーション法により決定した。

その結果、得られた塩基配列は、遺伝子産物の N 末部分をコードする領域を含み 5' 非翻訳領域として約 50 ヌクレオチドを含んでいた。予想される開始コドン ATG の位置が、コンセンサス配列と一致し、最長の ORF (「the first ATG rule」を満足する)を与えた。この cDNA の塩基配列において最も長い ORF に基づく 950 アミノ酸残基を遺伝子産物の推定アミノ酸配列とした。このアミノ酸配列を持つタンパク質を本発明者はメグー 1 (Meg-1)と名づけた。meg-1 cDNA の塩基配列を配列番号: 1 に、meg-1 の推定アミノ酸配列を配列番号: 2 に示す。

[実施例 6] メサングウム特異的遺伝子の機能解析 (1)

SwissProt データベースで FASTA プログラムによりアミノ酸ホモロジー検索を行ったところ、このメグー 1 が新規なタンパク質であることを確認した。またホモロジーを持つタンパク質としては、プロテインセリン/スレオニンフォスファターゼ 4 関連タンパク質 PP4_{R1} が確認された。メグー 1 と PP4_{R1} は、アミノ酸配列において 97.9%、cDNA の塩基配列においては 98.3% のホモロジーを持つ。その他、配列番号: 2 として示すアミノ酸配列の一部 (778 位-950 位の 173 アミノ酸残基) は、胎児脳由来の EST として登録された cDNA の塩基配列 (HSU79267) と塩基配列で 99.4%、アミノ酸配列で 100% 一致している。このクローンは IMAGE consortium による Soares library 1NIB に由来するもので、単に塩基配列の一部を決定したにすぎず、その機能やボディマッピングについてはまったく知られていない。

続いてメグー 1 のアミノ酸配列をモチーフ検索した。検索には、PSORT WWW Server (<http://psort.nibb.ac.jp:8800/>)、および MOTIF (<http://www.motif.genome.ad.jp/>) を利用した。その結果、メグー 1 はいくつかのリン酸化モチーフを含んでいることが明らかとなった。具体的には、以下のリン酸化酵素によるリン酸化モチーフの存在が確認された。その他に、6 つの N-グリコシレーション部位が認められた。更に核移行シグナルの存在が示唆され、推測される核局在は 52.2% であった。

cAMP/cGMP 依存性タンパク質リン酸化部位：1

カゼイン・カイネース II リン酸化部位：2 2

プロテインカイネース C リン酸化部位：1 1

チロシンカイネースリン酸化部位：2

また、これらの事実に基づいて、950 アミノ酸残基からなる上記推定アミノ酸配列がメグー 1 のアミノ酸配列であることが確認された。このアミノ酸配列からなるタンパク質の pI の理論値は 4.49 である。

〔実施例 7〕メグー 1 の機能解析 (2) - 組織分布

メグー 1 のノーザンブロット解析は、以下のようにして行った。3' 領域 cDNA ライブラリー (実施例 3) のポジティブクローンのインサートを、ランダム DNA ラベリングによって RI 標識しプローブとして用いた。試料として以下の細胞から単離した poly(A)⁺RNA (2 μ g) を、2.2M ホルムアミドを含む 1% アガロースゲルで分離し、ニトロセルロースフィルターへ転写した。フィルターを Rapid Hyb 溶液 (Amersham 社, Arlington Heights, IL) 中でハイブリダイズさせた。ハイブリダイズ後に、60℃ で、0.1×SSPE/0.1%SDS という最終ストリンジェンシーで洗浄した。

ヒトの複数の初代培養細胞および組織のノーザンブロット、ヒトの癌細胞株のノーザンブロットのための試料は、Clontech (Palo Alto, CA) から購入した。初代培養細胞としては、メサングウム細胞、ヒト皮膚上皮細胞、ヒト腎皮質上皮

細胞、ヒト臍帯静脈内皮細胞、およびヒト平滑筋細胞の初代培養細胞由来の $2\mu\text{g}$ の poly(A)⁺RNA を試料とした。ヒトの癌細胞株のノーザンブロットには、前骨髄球白血病 HL-60、HeLa 細胞 S3、慢性骨髄性白血病 K-562、リンパ芽球白血病 MOLT-4、Burkitt リンパ腫 Raji、大腸腺癌 SW480、肺癌 A549、および黒色腫 G361 由来の $2\mu\text{g}$ の poly(A)⁺RNA を試料とした。組織のノーザンブロットには、心、脳、胎盤、肺、肝、骨格筋、腎、および脾由来の $2\mu\text{g}$ の poly(A)⁺RNA を試料とした。ハイブリダイゼーションおよび洗浄は上記と同様にして行った。結果は表 1 - 表 3 に示すとおりである。

表 1

初代培養細胞	
ヒトメサングウム細胞	+++
ヒト皮膚繊維芽細胞	++
ヒト腎皮質上皮細胞	+
ヒト臍帯静脈内皮細胞	±~+
ヒト平滑筋細胞	±~+

表 2

ヒト癌細胞株	
前骨髄球白血病 HL-60	++
HeLa 細胞 S3	+++
慢性骨髄性白血病 K-562	+++
リンパ芽球白血病 MOLT-4	+++
Burkitt リンパ腫 Raji	-~±
大腸腺癌 SW480	+++
肺癌 A549	+++
黒色腫 G361	++

表 3

ヒト組織	
心	+++
脳	++
胎盤	+++
肺	—
肝	+
骨格筋	++
腎	++
脾	++

メグー 1 cDNA プローブを用いたノーザンブロット解析で、メサングウム培養細胞に単一の転写産物（約 4.5kb）が検出された。ヒトの初代培養細胞においては、メグー 1 遺伝子がメサングウム細胞で特に高度に発現していることが特徴的であった。その他の初代培養細胞では、皮膚繊維芽細胞や腎皮質上皮細胞で発現が観察され、臍帯静脈内皮細胞、平滑筋細胞においてはわずかな発現が観察された。組織間の比較においては心および胎盤、次いで脳、骨格筋、腎および脾において高度な発現が観察された。その他に肝で弱い発現が観察され、肺での発現は観察されなかった。培養癌細胞株においては HeLa 細胞 S3、慢性骨髄性白血病 K-562、リンパ芽球白血病 MOLT-4、大腸腺癌 SW480、および肺癌 A549 で強い発現が観察され、前骨髄白血病 HL-60、黒色腫 G361 でも発現が見られた。Burkitt リンパ腫 Raji では、ほとんど発現が見られなかった。

[実施例 8] メグー 1 の機能解析 (3) —インサイチュハイブリダイゼーション

健康人の腎臓から得られたヒト腎組織を用いたインサイチュハイブリダイゼーションにより、メグー 1 の mRNA の組織内における発現状態を評価した。インサ

イチュハイブリダイゼーションは、公知の方法により行った (Kidney Int., 52, 111 (1997))。ヒト・メグー1 の 2 8 7 9 ~ 2 9 1 2 位の塩基配列 (配列番号: 1 0) をプローブとして用いた。図 1 および図 2 に示すように、糸球体のメサンギウム領域の細胞がメグー1 mRNA 陽性であることを確認した。

[実施例 9] ラット・メグー 1

メグー 1 のラットにおけるホモログの取得を試みた。

ラットの腎メサンギウム細胞から全RNAを採取し、cDNAを合成した。このcDNAを鋳型として、ヒトメグー 1 の塩基配列に基づいて各種のdegenetative primerを用いてPCRを行った。degenetative primerは、ヒト・メグー 1 における以下の領域に相当する部分に設定した。

センス鎖: 1nt-18nt

アンチセンス鎖: 2852nt-2872nt

予測された大きさの増幅産物をクローニングし、塩基配列を決定した。更に、3末端はmarathorn法 (メグシンを単離同定したときと同様の方法) によって、一部の塩基配列を決定した。得られた塩基配列を配列番号: 1 1 に、また推定アミノ酸配列を配列番号: 1 2 に示す。

その結果、これまで報告されていない新規な塩基配列からなるラット・メグー 1 ホモログが単離された。ラット・メグー 1 は、遺伝子レベルで74.3%、蛋白レベルで86.3%と、ヒト・メグー 1 に対して高度に保存された構造を有する。

更に、ラットにおけるラット・メグー 1 の細胞、組織局在を、試料とプローブが異なる他は実施例 7 と同様の方法により解析した。結果は次のとおりである。

脳	+
肺	+++
心臓	+
肝臓	+

脾臓	++
腎臓	++
平滑筋	-～+
メサングウム細胞	+++
腎上皮細胞	-～+
腎内皮細胞	-～+

メグー 1 は、ヒトにもラットにも種を越えて腎臓（特にメサングウム細胞）に高発現していることから、メサングウム細胞の機能に関与する機能遺伝子の一つである可能性が考えられる。

〔実施例 10〕メサングウム増殖性腎炎を誘発させた糸球体におけるメグー 1 の特異的発現

ラットにおいて、ラット Thy1 抗原に対するモノクローナル抗体の投与によりメサングウム増殖性腎炎が誘発されることが知られている（Yagi M, Yamamoto T, Nagano N, Kato S, Kusaka M, Kawasaki K, Yaoita E, Kihara T: Transient expression of type I collagen in glomeruli with anti-Thy-1 antibody-induced mesangial proliferative lesions. *Pathol Int* 45: 409-414, 1995）。この方法によりメサングウム増殖性腎炎を誘発させたラットの糸球体におけるメグー 1 の発現をノーザンブロット解析により検出した。

抗ラット Thy1 モノクローナル抗体の調製は、この抗体を産生するハイブリドーマ（European Collection of Animal Cell Cultures (Sulisbury, UK)より購入）を用いて行った（Salant DJ, Darby C, Couser WG: Experimental membranous glomerulonephritis in rats. *J Clin Invest* 66: 71-81, 1980）。すなわち、このハイブリドーマを RPMI-1640 培地（10% ウシ胎児血清を含む）で培養したのち、 1×10^6 個の細胞を RPMI-1640 培地 0.5mL に懸濁し、7 日前にあらかじめ不完全フロイントアジュバントを腹腔内にインジェクションしておいた Balb/c マウ

ス（オス、10 週齢）の腹腔に接種した。接種後 2 週間以内にこのマウスから腹水を得、遠心で不溶物を除いたのち、上清を回収した。この上清を PBS に対して透析し、IgG を多く含む画分を 50% 飽和の硫酸アンモニウムにより沈殿させた。IgG を精製するために、粗製抗体を HiTrap Protein A カラム（Pharmacia Biotech (Tokyo, Japan)）にかけた。カラムに吸着した IgG は溶出液（0.1 M クエン酸ナトリウム、pH5）にて溶出し、PBS に対して透析したのち、実験に用いた。

メサングウム増殖性腎炎を誘発させたラットの糸球体におけるメグー 1 mRNA の発現は以下のように検出した。なお、すべての動物実験は Guide for Animal Experimentation（東京大学医学部）に従って行った。まず、ウィスターラット（オス、6 週齢、Charles River Japan (Yokohama, Japan)より購入）を 1 週間飼育したのち、体重 1kg あたり 1.2mg の IgG1 マウスモノクローナル抗 Thy1 抗体（0X7）を静脈内注射により投与した。また、コントロールとして媒体のみを同様に投与したラットも用意した。投与前、および投与後 2, 4, 7, 14 および 28 日目にそれぞれ 6 匹のラットから腎臓を摘出し、細分化して篩を通過させることにより、糸球体を分離した。この糸球体から全 RNA を単離し、ノーザンブロット解析にかけた。その際、プローブとして、ラット・メグー 1 の 841~1979 位の塩基配列（配列番号：13）を持つフラグメントを用いた。この領域はプロテインフォスファターゼ 2A（PP2A）の A ユニット（調節ユニット）とはホモロジーが低く、プローブとして適している。プローブの調製は、ラットメサングウム細胞の cDNA を鋳型にした PCR により増幅した断片を pGEM-T easy にサブクローニングし、EcoRI で切り出すことにより行った。

ノーザンブロット解析の結果、抗 Thy1 抗体によりメサングウム増殖性腎炎が誘発された糸球体において、メグー 1 の発現が著しく増加していることが確認された（図 3）。

本発明により、メサングウム細胞に高頻度に発現している DNA、該 DNA のコードするタンパク質、該タンパク質に結合する抗体等が提供された。これらはメサングウム細胞に特異的な生理活性に深く関与していると推測され、メサングウム細胞の同定、メサングウム細胞の異常の検出などに有用である。更に、該タンパク質の機能からメサングウム細胞の機能が明らかになり、メサングウム細胞に関連する疾患の原因究明への展開が期待される。また、メサングウム増殖性腎炎のようなメサングウム細胞に関連する疾病の治療、診断等への応用が期待される。

具体的には、たとえばメグー 1 の人為的な調節によって、糸球体腎炎の発症や進展を制御できる可能性がある。あるいはメサングウム細胞や体液中のメグー 1 タンパク質や mRNA の定量によって、糸球体腎炎などの腎疾患の診断が可能となることが期待できる。糸球体腎炎ではメサングウム領域の機能異常が見られ、メサングウム細胞の増殖、あるいは細胞からのマトリックス基質の産生亢進が起きている。これらの病態にメグー 1 が関与している可能性は十分に考えられる。

本発明によるメグー 1 は、メサングウム細胞で高度に発現しているという点では、本発明者が先に報告したメグシンと共通の特徴を備えている。しかしながら本発明によるメグー 1 はホスファターゼとの相同性を示し、核移行シグナルを持った核タンパク質である可能性が示唆されるのに対して、メグシンはプロテアーゼインヒビターである SERPIN スーパーファミリーとの相同性を持つタンパク質である。また本発明によるメグー 1 が比較的広範囲な組織において発現が観察されている点は、メグシンのメサングウム細胞に特異的に発現しているという特徴と相違する。したがって本発明によるメグー 1 は、メサングウム細胞の機能を支える重要なタンパク質である可能性を持っている。このような重要なタンパク質の存在を明らかにした本発明の意義は大きい。

請求の範囲

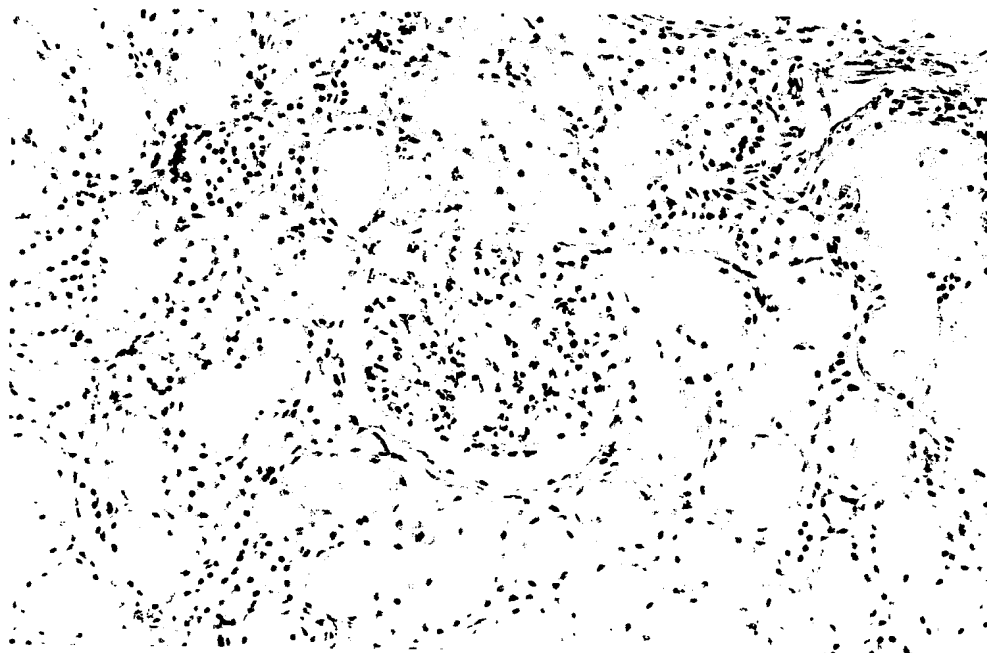
1. 下記（a）から（d）のいずれかに記載のポリヌクレオチド。
 - （a）配列番号：1 に記載された塩基配列の蛋白質コード領域を含むポリヌクレオチド。
 - （b）配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質をコードするポリヌクレオチド。
 - （c）配列番号：2 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは複数のアミノ酸が置換、欠失、挿入、および／または付加したアミノ酸配列からなり、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。
 - （d）配列番号：1 に記載された塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、配列番号：2 に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質と機能的に同等な蛋白質をコードするポリヌクレオチド。
2. 請求項 1 に記載のポリヌクレオチドのいずれかによってコードされる蛋白質。
3. 請求項 1 に記載されたポリヌクレオチドのいずれかを含むベクター。
4. 請求項 1 に記載されたポリヌクレオチドのいずれか、または請求項 3 に記載のベクターを保持する形質転換体。
5. 請求項 4 に記載の形質転換体を培養し、発現産物を回収する工程を含む、請求項 2 に記載の蛋白質の製造方法。
6. 配列番号：1 に記載された塩基配列、またはその相補鎖に相補的な塩基配列からなる 15 ヌクレオチド以上の鎖長を持つオリゴヌクレオチド。
7. 請求項 6 に記載のオリゴヌクレオチドと被検試料を接触させ、このオリゴヌクレオチドのハイブリダイズを観察する工程を含む、配列番号：1 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドの検出方法。

8. 請求項 6 に記載のオリゴヌクレオチドと被検試料を接触させ、このオリゴヌクレオチドをプライマーとして相補鎖を合成する工程を含む、配列番号：1 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチドの合成方法。
9. 請求項 6 に記載のオリゴヌクレオチドを含むメサングウム細胞の検出用試薬。
10. 生体試料中における請求項 1 に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定し、正常試料から得られた測定値と比較することによってメサングウム増殖性腎炎を検出する方法。
11. 生体試料がメサングウム細胞である請求項 10 に記載の方法。
12. 発現レベルを、配列番号：1 に記載の塩基配列から選択された塩基配列からなる mRNA を指標として測定する請求項 10 に記載の方法。
13. 発現レベルを、請求項 2 に記載のタンパク質またはその断片を指標として測定する請求項 10 に記載の方法。
14. 請求項 1 に記載のポリヌクレオチド、またはその一部に対するアンチセンスポリヌクレオチド。
15. 請求項 2 に記載の蛋白質を認識する抗体。
16. 配列番号：2 のアミノ酸配列から選択されたアミノ酸配列を持つタンパク質の一部を認識する請求項 15 に記載の抗体。
17. 請求項 15 に記載の抗体と請求項 2 に記載のタンパク質、またはその断片との免疫学的な結合に基づいて請求項 2 に記載のタンパク質またはその断片を測定する免疫学的測定方法。
18. 請求項 15 に記載の抗体を含む請求項 2 に記載のタンパク質またはその断片の免疫学的測定用試薬。
19. メグー 1 をコードする遺伝子の発現レベルを変化させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物。
20. 非ヒト脊椎動物がマウスである請求項 19 に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

21. メグー 1 をコードする遺伝子の発現が抑制されたノックアウトマウスである請求項 20 に記載のトランスジェニック非ヒト脊椎動物。

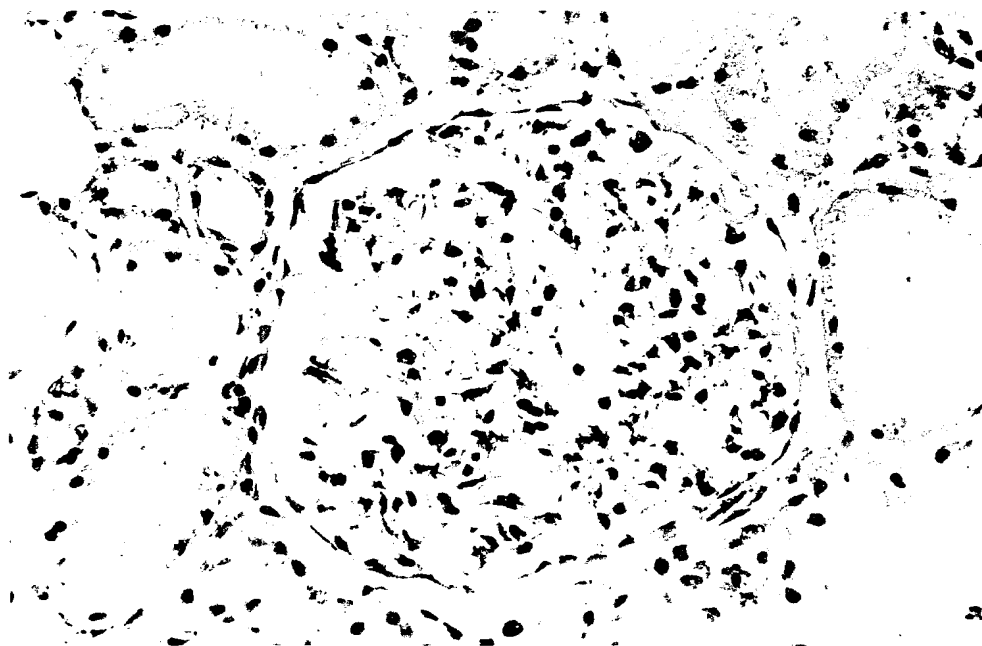
1/3

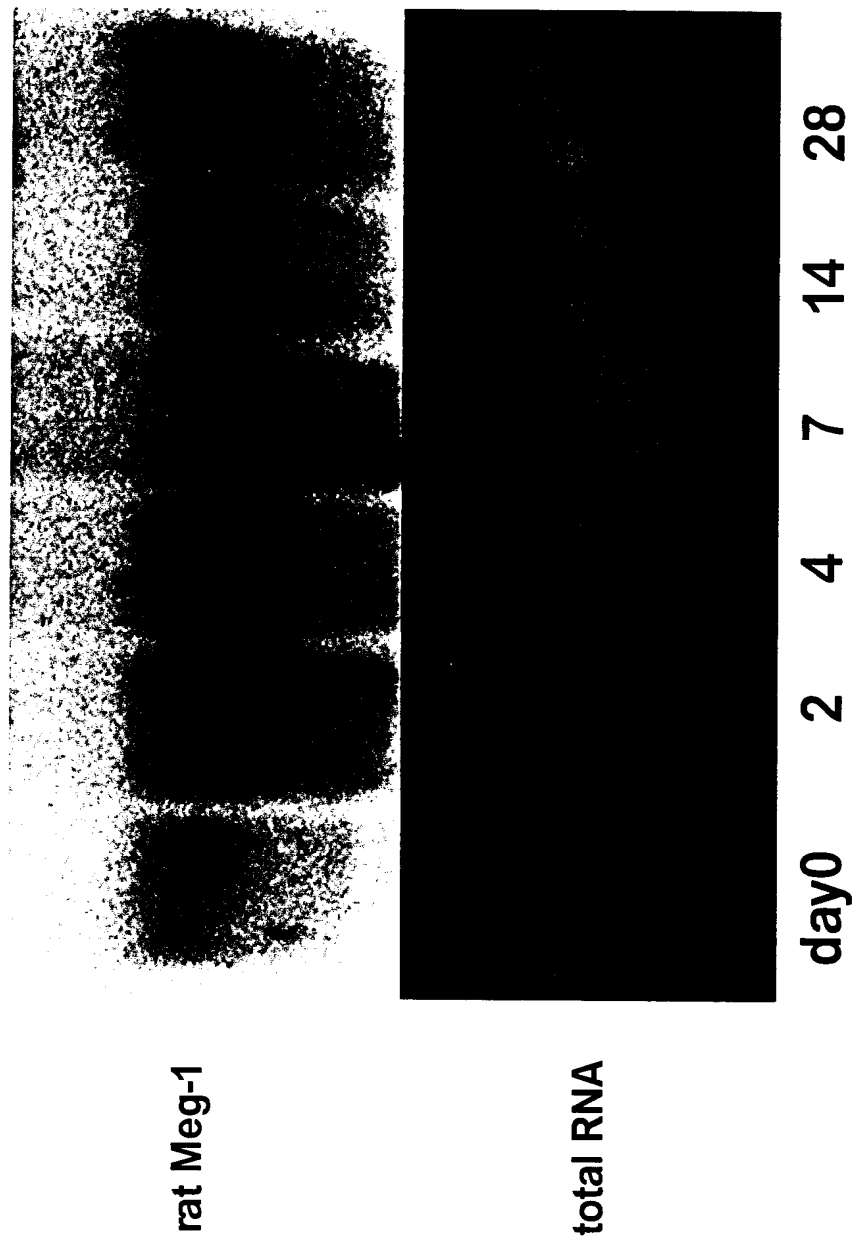
図 1



2/3

図 2





SEQUENCE LISTING

<110> MIYATA, TOSHIO
KUROKAWA, KIYOSHI

<120> Meg-1 protein

<130> KRK-102PCT

<140>

<141>

<150> JP 1999-233301

<151> 1999-08-19

<160> 13

<170> PatentIn Ver. 2.0

$\langle 210 \rangle$ 1

<211> 3901

〈212〉 DNA

〈213〉 Homo sapiens

<220>

<221> CDS

<222> (23) .. (2872)

<400> 1

gggaggaggg	ggcgaccaca	ag	atg	gcg	gac	ctc	tcg	ctg	ctt	cag	gag	gac	52			
			Met	Ala	Asp	Leu	Ser	Leu	Leu	Gln	Glu	Asp				
			1				5					10				
ctg	cag	gag	gac	gca	gac	gga	ttt	ggt	gtg	gat	gac	tac	agc	tca	gag	100
Leu	Gln	Glu	Asp	Ala	Asp	Gly	Phe	Gly	Val	Asp	Asp	Tyr	Ser	Ser	Glu	
				15					20					25		
tct	gat	gtg	att	att	ata	cct	tca	gcc	ctg	gac	ttt	gtc	tca	caa	gat	148
Ser	Asp	Val	Ile	Ile	Ile	Pro	Ser	Ala	Leu	Asp	Phe	Val	Ser	Gln	Asp	
			30					35					40			
gaa	atg	ttg	acg	ccc	ctg	ggg	aga	ttg	gac	aag	tat	gct	gca	agt	gag	196
Glu	Met	Leu	Thr	Pro	Leu	Gly	Arg	Leu	Asp	Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Glu	
		45					50					55				
aac	ata	ttt	aac	aga	caa	atg	gtg	gcc	cgg	agt	ttg	ctc	gat	acc	ttg	244
Asn	Ile	Phe	Asn	Arg	Gln	Met	Val	Ala	Arg	Ser	Leu	Leu	Asp	Thr	Leu	
	60					65					70					

2/23

agg gaa gtc tgc gat gat gaa aga gat tgt att gct gtt ttg gaa aga	292
Arg Glu Val Cys Asp Asp Glu Arg Asp Cys Ile Ala Val Leu Glu Arg	
75 80 85 90	
att agc aga ttg gcc gat gat tca gaa cca act gtg aga gcg gag ctg	340
Ile Ser Arg Leu Ala Asp Asp Ser Glu Pro Thr Val Arg Ala Glu Leu	
95 100 105	
atg gaa cag gtg cct cac atc gca ctg ttt tgt caa gaa aac cgg cct	388
Met Glu Gln Val Pro His Ile Ala Leu Phe Cys Gln Glu Asn Arg Pro	
110 115 120	
tca ata cca tat gct ttt tca aaa ttc tta cta cct att gtg gtt aga	436
Ser Ile Pro Tyr Ala Phe Ser Lys Phe Leu Leu Pro Ile Val Val Arg	
125 130 135	
tac ctt gca gat cag aat aat cag gtg agg aaa aca agt cag gca gct	484
Tyr Leu Ala Asp Gln Asn Asn Gln Val Arg Lys Thr Ser Gln Ala Ala	
140 145 150	
ttg ctg gct ctg ttg gag cag gag ctc att gaa cga ttt gat gtg gag	532
Leu Leu Ala Leu Leu Glu Gln Glu Leu Ile Glu Arg Phe Asp Val Glu	
155 160 165 170	
acc aaa gtg tgg cct gtc ctc ata gag ctg aca gcc cca gat agc aat	580
Thr Lys Val Trp Pro Val Leu Ile Glu Leu Thr Ala Pro Asp Ser Asn	
175 180 185	
gat gat gtg aaa aca gaa gct gtg gct ata atg tgc aaa atg gct ccc	628
Asp Asp Val Lys Thr Glu Ala Val Ala Ile Met Cys Lys Met Ala Pro	
190 195 200	
atg gtt ggg aag gat att aca gag cgt ctt atc ctc cct agg ttt tgt	676
Met Val Gly Lys Asp Ile Thr Glu Arg Leu Ile Leu Pro Arg Phe Cys	
205 210 215	
gag atg tgc tgc gat tgc aga atg ttt cac gtt cga aag gtc tgt gct	724
Glu Met Cys Cys Asp Cys Arg Met Phe His Val Arg Lys Val Cys Ala	
220 225 230	
gcc aat ttt gga gat att tgc agt gta gtt ggc cag caa gct act gaa	772
Ala Asn Phe Gly Asp Ile Cys Ser Val Val Gly Gln Gln Ala Thr Glu	
235 240 245 250	
gaa atg ttg ctg ccc aga ttt ttc cag ctt tgt tct gat aat gta tgg	820
Glu Met Leu Leu Pro Arg Phe Phe Gln Leu Cys Ser Asp Asn Val Trp	
255 260 265	

3/23

gga gtc cga aag gct tgt gct gaa tgc ttc atg gcg gtt tca tgt gca	868
Gly Val Arg Lys Ala Cys Ala Glu Cys Phe Met Ala Val Ser Cys Ala	
270 275 280	
aca tgt caa gaa atc cga cgg acc aaa tta tca gca ctt ttt att aat	916
Thr Cys Gln Glu Ile Arg Arg Thr Lys Leu Ser Ala Leu Phe Ile Asn	
285 290 295	
ttg atc agt gat cct tca cgt tgg gtt cgc caa gca gct ttt cag tct	964
Leu Ile Ser Asp Pro Ser Arg Trp Val Arg Gln Ala Phe Gln Ser	
300 305 310	
ctg gga cct ttc ata tct act ttt gct aat cca tct agc tca ggc cag	1012
Leu Gly Pro Phe Ile Ser Thr Phe Ala Asn Pro Ser Ser Ser Gly Gln	
315 320 325 330	
tat ttt aaa gaa gaa agc aaa agt tca gaa gag atg tca gta gaa aac	1060
Tyr Phe Lys Glu Glu Ser Lys Ser Ser Glu Glu Met Ser Val Glu Asn	
335 340 345	
aaa aat agg acc aga gat caa gaa gcc cca gag gat gta caa gtc agg	1108
Lys Asn Arg Thr Arg Asp Gln Glu Ala Pro Glu Asp Val Gln Val Arg	
350 355 360	
cca gag gat act cct tca gat ctc agt gtt agt aat tcc agt gtc ata	1156
Pro Glu Asp Thr Pro Ser Asp Leu Ser Val Ser Asn Ser Ser Val Ile	
365 370 375	
ctg gaa aac acg atg gaa gac cat gct gct gag gca tcc ggg aag cct	1204
Leu Glu Asn Thr Met Glu Asp His Ala Ala Glu Ala Ser Gly Lys Pro	
380 385 390	
cta ggt gaa att agt gtt cca ctg gac agc tct tta ctt tgt act ttg	1252
Leu Gly Glu Ile Ser Val Pro Leu Asp Ser Ser Leu Leu Cys Thr Leu	
395 400 405 410	
tcc tca gaa tct cac cag gaa gca gct agt aat gag aat gat aaa aaa	1300
Ser Ser Glu Ser His Gln Glu Ala Ala Ser Asn Glu Asn Asp Lys Lys	
415 420 425	
cct ggt aac tac aaa tct atg tta cga cca gag gtt ggc acc act tca	1348
Pro Gly Asn Tyr Lys Ser Met Leu Arg Pro Glu Val Gly Thr Thr Ser	
430 435 440	
caa gat tca gct ctc tta gat cag gaa ttg tat aac tcc ttc cat ttc	1396
Gln Asp Ser Ala Leu Leu Asp Gln Glu Leu Tyr Asn Ser Phe His Phe	
445 450 455	

4/23

tgg	agg	act	cct	ctt	cct	gaa	ata	gat	cta	gac	ata	gag	ctt	gaa	cag	1444
Trp	Arg	Thr	Pro	Leu	Pro	Glu	Ile	Asp	Leu	Asp	Ile	Glu	Leu	Glu	Gln	
460						465					470					
aac	tct	ggg	gga	aaa	ccc	agc	cca	gag	gga	cca	gag	gaa	gaa	tct	gag	1492
Asn	Ser	Gly	Gly	Lys	Pro	Ser	Pro	Glu	Gly	Pro	Glu	Glu	Glu	Ser	Glu	
475					480					485					490	
ggc	cct	gtg	ccc	agt	tct	cca	aac	atc	acc	atg	gcc	acc	aga	aag	gaa	1540
Gly	Pro	Val	Pro	Ser	Ser	Pro	Asn	Ile	Thr	Met	Ala	Thr	Arg	Lys	Glu	
				495					500					505		
ctg	gaa	gaa	atg	ata	gaa	aat	cta	gag	ccc	cac	att	gat	gat	cca	gat	1588
Leu	Glu	Glu	Met	Ile	Glu	Asn	Leu	Glu	Pro	His	Ile	Asp	Asp	Pro	Asp	
			510					515					520			
gtt	aaa	gca	caa	gtg	gaa	gtg	ctg	tcc	gct	gca	cta	cgt	gct	tcc	agc	1636
Val	Lys	Ala	Gln	Val	Glu	Val	Leu	Ser	Ala	Ala	Leu	Arg	Ala	Ser	Ser	
		525					530					535				
ctg	gat	gca	cat	gaa	gag	acc	atc	agt	ata	gaa	aag	aga	agt	gat	ttg	1684
Leu	Asp	Ala	His	Glu	Glu	Thr	Ile	Ser	Ile	Glu	Lys	Arg	Ser	Asp	Leu	
	540					545					550					
caa	gat	gaa	ctg	gat	ata	aat	gag	cta	cca	aat	tgt	aaa	ata	aat	caa	1732
Gln	Asp	Glu	Leu	Asp	Ile	Asn	Glu	Leu	Pro	Asn	Cys	Lys	Ile	Asn	Gln	
555					560					565					570	
gaa	gat	tct	gtg	cct	tta	atc	agc	gat	gct	gtt	gag	aat	atg	gac	tcc	1780
Glu	Asp	Ser	Val	Pro	Leu	Ile	Ser	Asp	Ala	Val	Glu	Asn	Met	Asp	Ser	
				575					580					585		
act	ctt	cac	tat	att	cac	aac	gat	tca	gac	ttg	agc	aac	aat	agc	agt	1828
Thr	Leu	His	Tyr	Ile	His	Asn	Asp	Ser	Asp	Leu	Ser	Asn	Asn	Ser	Ser	
			590					595					600			
ttt	agc	cct	gat	gag	gaa	agg	aga	act	aaa	gta	caa	gat	gtt	gta	cct	1876
Phe	Ser	Pro	Asp	Glu	Glu	Arg	Arg	Thr	Lys	Val	Gln	Asp	Val	Val	Pro	
		605					610					615				
cag	gcg	ttg	tta	gat	cag	tat	tta	tct	atg	act	gac	cct	tct	cgt	gca	1924
Gln	Ala	Leu	Leu	Asp	Gln	Tyr	Leu	Ser	Met	Thr	Asp	Pro	Ser	Arg	Ala	
	620					625					630					
cag	acg	gtt	gac	act	gaa	att	gct	aag	cac	tgt	gca	tat	agc	ctc	cct	1972
Gln	Thr	Val	Asp	Thr	Glu	Ile	Ala	Lys	His	Cys	Ala	Tyr	Ser	Leu	Pro	
635					640					645					650	

5/23

ggt	gtg	gcc	ttg	aca	ctc	gga	aga	cag	aat	tgg	cac	tgc	ctg	aga	gag	2020
Gly	Val	Ala	Leu	Thr	Leu	Gly	Arg	Gln	Asn	Trp	His	Cys	Leu	Arg	Glu	
				655					660						665	
acg	tat	gag	act	ctg	gcc	tca	gac	atg	cag	tgg	aaa	ggt	cga	cga	act	2068
Thr	Tyr	Glu	Thr	Leu	Ala	Ser	Asp	Met	Gln	Trp	Lys	Val	Arg	Arg	Thr	
				670				675						680		
cta	gca	ttc	tcc	atc	cac	gag	ctt	gca	ggt	att	ctt	gga	gat	caa	ttg	2116
Leu	Ala	Phe	Ser	Ile	His	Glu	Leu	Ala	Val	Ile	Leu	Gly	Asp	Gln	Leu	
		685						690					695			
aca	gct	gca	gat	ctg	ggt	cca	att	ttt	aat	gga	ttt	tta	aaa	gac	ctc	2164
Thr	Ala	Ala	Asp	Leu	Val	Pro	Ile	Phe	Asn	Gly	Phe	Leu	Lys	Asp	Leu	
	700					705					710					
gat	gaa	gtc	agg	ata	ggt	ggt	ctt	aaa	cac	ttg	cat	gat	ttt	ctg	aag	2212
Asp	Glu	Val	Arg	Ile	Gly	Val	Leu	Lys	His	Leu	His	Asp	Phe	Leu	Lys	
715					720					725					730	
ctt	ctt	cat	att	gac	aaa	aga	aga	gaa	tat	ctt	tat	caa	ctt	cag	gag	2260
Leu	Leu	His	Ile	Asp	Lys	Arg	Arg	Glu	Tyr	Leu	Tyr	Gln	Leu	Gln	Glu	
				735					740					745		
ttt	ttg	gtg	aca	gat	aat	agt	aga	aat	tgg	cgg	ttt	cga	gct	gaa	ctg	2308
Phe	Leu	Val	Thr	Asp	Asn	Ser	Arg	Asn	Trp	Arg	Phe	Arg	Ala	Glu	Leu	
			750					755					760			
gct	gaa	cag	ctg	att	tta	ctt	cta	gag	tta	tat	agt	ccc	aga	gat	ggt	2356
Ala	Glu	Gln	Leu	Ile	Leu	Leu	Leu	Glu	Leu	Tyr	Ser	Pro	Arg	Asp	Val	
		765					770					775				
tat	gac	tat	tta	cgt	ccc	att	gct	ctg	aat	ctg	tgt	gca	gac	aaa	ggt	2404
Tyr	Asp	Tyr	Leu	Arg	Pro	Ile	Ala	Leu	Asn	Leu	Cys	Ala	Asp	Lys	Val	
	780					785					790					
tct	tct	ggt	cgt	tgg	att	tcc	tac	aag	ttg	gtc	agc	gag	atg	gtg	aag	2452
Ser	Ser	Val	Arg	Trp	Ile	Ser	Tyr	Lys	Leu	Val	Ser	Glu	Met	Val	Lys	
795					800					805					810	
aag	ctg	cac	gcg	gca	aca	cca	cca	acg	ttc	gga	gtg	gac	ctc	atc	aat	2500
Lys	Leu	His	Ala	Ala	Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Val	Asp	Leu	Ile	Asn	
			815						820						825	
gag	ctt	gtg	gag	aac	ttt	ggc	aga	tgt	ccc	aag	tgg	tct	ggt	cgg	caa	2548
Glu	Leu	Val	Glu	Asn	Phe	Gly	Arg	Cys	Pro	Lys	Trp	Ser	Gly	Arg	Gln	
			830					835						840		

6/23

gcc ttt gtc ttt gtc tgc cag act gtc att gag gat gac tgc ctt ccc	2596
Ala Phe Val Phe Val Cys Gln Thr Val Ile Glu Asp Asp Cys Leu Pro	
845 850 855	
atg gac cag ttt gct gtg cat ctc atg ccg cat ctg cta acc tta gca	2644
Met Asp Gln Phe Ala Val His Leu Met Pro His Leu Leu Thr Leu Ala	
860 865 870	
aat gac agg gtt cct aac gtg cga gtg ctg ctt gca aag aca tta aga	2692
Asn Asp Arg Val Pro Asn Val Arg Val Leu Leu Ala Lys Thr Leu Arg	
875 880 885 890	
caa act cta cta gaa aaa gac tat ttc ttg gcc tct gcc agc tgc cac	2740
Gln Thr Leu Leu Glu Lys Asp Tyr Phe Leu Ala Ser Ala Ser Cys His	
895 900 905	
cag gag gct gtg gag cag acc atc atg gct ctt cag atg gac cgt gac	2788
Gln Glu Ala Val Glu Gln Thr Ile Met Ala Leu Gln Met Asp Arg Asp	
910 915 920	
agc gat gtc aag tat ttt gca agc atc cac cct gcc agt acc aaa atc	2836
Ser Asp Val Lys Tyr Phe Ala Ser Ile His Pro Ala Ser Thr Lys Ile	
925 930 935	
tcc gaa gat gcc atg agc aca gcg tcc tca acc tac tagaaggctt	2882
Ser Glu Asp Ala Met Ser Thr Ala Ser Ser Thr Tyr	
940 945 950	
gaatctcggg gtcttttctg ctcccatgag agccgagggt cagtgggcat tcgccacgca	2942
tgtgacctgg gatagctttc gggggaggag agaccttcct ctctgcgga cttcattgca	3002
ggtgcaagtt gcctacaccc aataccagggt atttcaagag tcaagagaaa gtacagtaaa	3062
cactattatc ttatcttgac ttttaaggga aataatttct cagaggatta taattgtcac	3122
cgaagcctta aatccttctc ttcttgactg aatgaaactt gaattggcag agcattttcc	3182
ttatggaagg gatgagattc ccagagacct gcattgcttt ctctgggttt tatttaacaa	3242
tcgacaaatg aaattcttac agcctgaagg cagacgtgtg cccagatgtg aaagagacct	3302
tcagtatcag ccctaactct tctctcccag gaaggacttg ctgggctctg tggccagctg	3362
tccagcccag cctgtgtgt gaatcgtttg tgacgtgtgc aaatgggaaa ggaggggttt	3422
ttacatctcc taaaggacct gatgccaaca caagtaggat tgacttaaac tcttaagcgc	3482

7/23

agcatattgc tgtacacatt tacagaatgg ttgctgagtg tctgtgtctg attttttcat 3542
 gctgggtcatg acctgaagga aatttattag acgtataatg tatgtctggg gtttttaact 3602
 tgatcatgat cagctctgag gtgcaacttc ttcacatact gtacatacct gtgaccactc 3662
 ttgggagtg tgcagtcitt aatcatgctg tttaaactgt tgtggcaciaa gttctcttgt 3722
 ccaaataaaa tttattaata agatctatag agagagatat atacactttt gattgttttc 3782
 tagatgtcta ccaataaatg caatttgtga cctgtattaa tgatttaaag tggggaaact 3842
 agattaaaat atttgtcttt taaaaaata aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 3901

<210> 2
 <211> 950
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Met Ala Asp Leu Ser Leu Leu Gln Glu Asp Leu Gln Glu Asp Ala Asp
 1 5 10 15
 Gly Phe Gly Val Asp Asp Tyr Ser Ser Glu Ser Asp Val Ile Ile Ile
 20 25 30
 Pro Ser Ala Leu Asp Phe Val Ser Gln Asp Glu Met Leu Thr Pro Leu
 35 40 45
 Gly Arg Leu Asp Lys Tyr Ala Ala Ser Glu Asn Ile Phe Asn Arg Gln
 50 55 60
 Met Val Ala Arg Ser Leu Leu Asp Thr Leu Arg Glu Val Cys Asp Asp
 65 70 75 80
 Glu Arg Asp Cys Ile Ala Val Leu Glu Arg Ile Ser Arg Leu Ala Asp
 85 90 95
 Asp Ser Glu Pro Thr Val Arg Ala Glu Leu Met Glu Gln Val Pro His
 100 105 110
 Ile Ala Leu Phe Cys Gln Glu Asn Arg Pro Ser Ile Pro Tyr Ala Phe
 115 120 125
 Ser Lys Phe Leu Leu Pro Ile Val Val Arg Tyr Leu Ala Asp Gln Asn
 130 135 140

8/23

Asn	Gln	Val	Arg	Lys	Thr	Ser	Gln	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Glu	145	150	155	160
Gln	Glu	Leu	Ile	Glu	Arg	Phe	Asp	Val	Glu	Thr	Lys	Val	Trp	Pro	Val	165	170	175	
Leu	Ile	Glu	Leu	Thr	Ala	Pro	Asp	Ser	Asn	Asp	Asp	Val	Lys	Thr	Glu	180	185	190	
Ala	Val	Ala	Ile	Met	Cys	Lys	Met	Ala	Pro	Met	Val	Gly	Lys	Asp	Ile	195	200	205	
Thr	Glu	Arg	Leu	Ile	Leu	Pro	Arg	Phe	Cys	Glu	Met	Cys	Cys	Asp	Cys	210	215	220	
Arg	Met	Phe	His	Val	Arg	Lys	Val	Cys	Ala	Ala	Asn	Phe	Gly	Asp	Ile	225	230	235	240
Cys	Ser	Val	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Thr	Glu	Glu	Met	Leu	Leu	Pro	Arg	245	250	255	
Phe	Phe	Gln	Leu	Cys	Ser	Asp	Asn	Val	Trp	Gly	Val	Arg	Lys	Ala	Cys	260	265	270	
Ala	Glu	Cys	Phe	Met	Ala	Val	Ser	Cys	Ala	Thr	Cys	Gln	Glu	Ile	Arg	275	280	285	
Arg	Thr	Lys	Leu	Ser	Ala	Leu	Phe	Ile	Asn	Leu	Ile	Ser	Asp	Pro	Ser	290	295	300	
Arg	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Ala	Phe	Gln	Ser	Leu	Gly	Pro	Phe	Ile	Ser	305	310	315	320
Thr	Phe	Ala	Asn	Pro	Ser	Ser	Ser	Gly	Gln	Tyr	Phe	Lys	Glu	Glu	Ser	325	330	335	
Lys	Ser	Ser	Glu	Glu	Met	Ser	Val	Glu	Asn	Lys	Asn	Arg	Thr	Arg	Asp	340	345	350	
Gln	Glu	Ala	Pro	Glu	Asp	Val	Gln	Val	Arg	Pro	Glu	Asp	Thr	Pro	Ser	355	360	365	
Asp	Leu	Ser	Val	Ser	Asn	Ser	Ser	Val	Ile	Leu	Glu	Asn	Thr	Met	Glu	370	375	380	
Asp	His	Ala	Ala	Glu	Ala	Ser	Gly	Lys	Pro	Leu	Gly	Glu	Ile	Ser	Val	385	390	395	400

Pro	Leu	Asp	Ser	Ser 405	Leu	Leu	Cys	Thr	Leu 410	Ser	Ser	Glu	Ser	His 415	Gln
Glu	Ala	Ala	Ser 420	Asn	Glu	Asn	Asp	Lys 425	Lys	Pro	Gly	Asn	Tyr 430	Lys	Ser
Met	Leu	Arg 435	Pro	Glu	Val	Gly	Thr 440	Thr	Ser	Gln	Asp	Ser 445	Ala	Leu	Leu
Asp	Gln 450	Glu	Leu	Tyr	Asn	Ser 455	Phe	His	Phe	Trp	Arg 460	Thr	Pro	Leu	Pro
Glu 465	Ile	Asp	Leu	Asp	Ile 470	Glu	Leu	Glu	Gln	Asn 475	Ser	Gly	Gly	Lys	Pro 480
Ser	Pro	Glu	Gly	Pro 485	Glu	Glu	Glu	Ser	Glu 490	Gly	Pro	Val	Pro	Ser 495	Ser
Pro	Asn	Ile	Thr 500	Met	Ala	Thr	Arg	Lys 505	Glu	Leu	Glu	Glu	Met 510	Ile	Glu
Asn	Leu	Glu 515	Pro	His	Ile	Asp	Asp 520	Pro	Asp	Val	Lys	Ala 525	Gln	Val	Glu
Val	Leu 530	Ser	Ala	Ala	Leu	Arg 535	Ala	Ser	Ser	Leu	Asp 540	Ala	His	Glu	Glu
Thr 545	Ile	Ser	Ile	Glu	Lys 550	Arg	Ser	Asp	Leu	Gln 555	Asp	Glu	Leu	Asp	Ile 560
Asn	Glu	Leu	Pro	Asn 565	Cys	Lys	Ile	Asn	Gln 570	Glu	Asp	Ser	Val	Pro 575	Leu
Ile	Ser	Asp	Ala 580	Val	Glu	Asn	Met	Asp 585	Ser	Thr	Leu	His	Tyr 590	Ile	His
Asn	Asp	Ser 595	Asp	Leu	Ser	Asn	Asn 600	Ser	Ser	Phe	Ser	Pro 605	Asp	Glu	Glu
Arg	Arg 610	Thr	Lys	Val	Gln	Asp 615	Val	Val	Pro	Gln	Ala 620	Leu	Leu	Asp	Gln
Tyr 625	Leu	Ser	Met	Thr	Asp 630	Pro	Ser	Arg	Ala	Gln 635	Thr	Val	Asp	Thr	Glu 640
Ile	Ala	Lys	His	Cys 645	Ala	Tyr	Ser	Leu	Pro 650	Gly	Val	Ala	Leu	Thr 655	Leu

Gly 660	Arg	Gln	Asn	Trp	His	Cys	Leu	Arg 665	Glu	Thr	Tyr	Glu	Thr 670	Leu	Ala
Ser	Asp	Met 675	Gln	Trp	Lys	Val	Arg 680	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe 685	Ser	Ile	His
Glu	Leu 690	Ala	Val	Ile	Leu	Gly 695	Asp	Gln	Leu	Thr	Ala 700	Ala	Asp	Leu	Val
Pro 705	Ile	Phe	Asn	Gly	Phe 710	Leu	Lys	Asp	Leu	Asp 715	Glu	Val	Arg	Ile	Gly 720
Val	Leu	Lys	His	Leu 725	His	Asp	Phe	Leu	Lys 730	Leu	Leu	His	Ile	Asp 735	Lys
Arg	Arg	Glu	Tyr 740	Leu	Tyr	Gln	Leu	Gln 745	Glu	Phe	Leu	Val	Thr 750	Asp	Asn
Ser	Arg	Asn 755	Trp	Arg	Phe	Arg	Ala 760	Glu	Leu	Ala	Glu	Gln 765	Leu	Ile	Leu
Leu	Leu 770	Glu	Leu	Tyr	Ser	Pro 775	Arg	Asp	Val	Tyr	Asp 780	Tyr	Leu	Arg	Pro
Ile 785	Ala	Leu	Asn	Leu	Cys 790	Ala	Asp	Lys	Val	Ser 795	Ser	Val	Arg	Trp	Ile 800
Ser	Tyr	Lys	Leu	Val 805	Ser	Glu	Met	Val	Lys 810	Lys	Leu	His	Ala	Ala 815	Thr
Pro	Pro	Thr	Phe 820	Gly	Val	Asp	Leu	Ile 825	Asn	Glu	Leu	Val	Glu 830	Asn	Phe
Gly	Arg	Cys 835	Pro	Lys	Trp	Ser	Gly 840	Arg	Gln	Ala	Phe	Val 845	Phe	Val	Cys
Gln	Thr 850	Val	Ile	Glu	Asp	Asp 855	Cys	Leu	Pro	Met	Asp 860	Gln	Phe	Ala	Val
His 865	Leu	Met	Pro	His	Leu 870	Leu	Thr	Leu	Ala	Asn 875	Asp	Arg	Val	Pro	Asn 880
Val	Arg	Val	Leu	Leu 885	Ala	Lys	Thr	Leu	Arg 890	Gln	Thr	Leu	Leu	Glu 895	Lys
Asp	Tyr	Phe	Leu 900	Ala	Ser	Ala	Ser	Cys 905	His	Gln	Glu	Ala	Val 910	Glu	Gln

11/23

Thr Ile Met Ala Leu Gln Met Asp Arg Asp Ser Asp Val Lys Tyr Phe
 915 920 925

Ala Ser Ile His Pro Ala Ser Thr Lys Ile Ser Glu Asp Ala Met Ser
 930 935 940

Thr Ala Ser Ser Thr Tyr
 945 950

<210> 3
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence

<400> 3
 tgtaaaacga cggccagt 18

<210> 4
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence

<400> 4
 accatgatta cgccaagctt g 21

<210> 5
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Description of Artificial Sequence:Artificially
 Synthesized Primer Sequence

<220>
 <223> 5'-phosphorylation

12/23

<400> 5
tcagagaggt cattc 15

<210> 6
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6
tcattgatgg gtcctcaa 18

<210> 7
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7
agattcttga gctcagat 18

<210> 8
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8
aatggtggca taaacatg 18

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

13/23

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

acagacaaat tgaacttc

18

<210> 10

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Probe Sequence

<400> 10

ctcatggaag caggaaagac accgagattc aagc

34

<210> 11

<211> 3568

<212> DNA

<213> RATTUS NORVEGICUS

<220>

<221> CDS

<222> (7)..(2862)

<400> 11

cacaag atg gcg gac ctc tcg ctg ctc cag gag gac ctg ccg gag gac
Met Ala Asp Leu Ser Leu Leu Gln Glu Asp Leu Pro Glu Asp
1 5 10

48

gcg gac gga ctt ggt gtg gat gac tac agc tca gag tct gat gtg att
Ala Asp Gly Leu Gly Val Asp Asp Tyr Ser Ser Glu Ser Asp Val Ile
15 20 25 30

96

att ata cct tca gcc ctg gac ttc gtc tca caa gat gaa atg ttg aca
Ile Ile Pro Ser Ala Leu Asp Phe Val Ser Gln Asp Glu Met Leu Thr
35 40 45

144

ccc ttg ggg agg ctg gac aag tat gct gca agt gag aac gtc ttt aac
Pro Leu Gly Arg Leu Asp Lys Tyr Ala Ala Ser Glu Asn Val Phe Asn
50 55 60

192

14/23

aga caa atg gtg gcc cgg agt ttg ctg gat act ctg agg gaa gtc tgt	240
Arg Gln Met Val Ala Arg Ser Leu Leu Asp Thr Leu Arg Glu Val Cys	
65 70 75	
ggt gag gag aga gac tgc att gct gtc ttg gaa agg atc agc cga ttg	288
Gly Glu Glu Arg Asp Cys Ile Ala Val Leu Glu Arg Ile Ser Arg Leu	
80 85 90	
gct gat gac tca gaa cca acc gtg aga gcc gag ctg atg gaa cag gtg	336
Ala Asp Asp Ser Glu Pro Thr Val Arg Ala Glu Leu Met Glu Gln Val	
95 100 105 110	
cgc cac atc gca ctg ttt tgt caa gag aac cga cct tcc ata cca tat	384
Pro His Ile Ala Leu Phe Cys Gln Glu Asn Arg Pro Ser Ile Pro Tyr	
115 120 125	
gcc ttt tcc aag tac tta ctg cca atc gtg gtt aga tac ctt gca gac	432
Ala Phe Ser Lys Tyr Leu Leu Pro Ile Val Val Arg Tyr Leu Ala Asp	
130 135 140	
cag aat aac cag gtg agg aaa acc agc cag gca gct ttg ctg gct ctg	480
Gln Asn Asn Gln Val Arg Lys Thr Ser Gln Ala Ala Leu Leu Ala Leu	
145 150 155	
ctg gag cag gag ctg att gag cga ctc gat gtg gag acc aag gtg tgc	528
Leu Glu Gln Glu Leu Ile Glu Arg Leu Asp Val Glu Thr Lys Val Cys	
160 165 170	
ccc gtc ctc ata gac ttg act gcc cca gac agc aat gac gat gtg aag	576
Pro Val Leu Ile Asp Leu Thr Ala Pro Asp Ser Asn Asp Asp Val Lys	
175 180 185 190	
aca gag gcc gtg gct ata atg tgc aag atg gcc ccc atg gtt ggg aaa	624
Thr Glu Ala Val Ala Ile Met Cys Lys Met Ala Pro Met Val Gly Lys	
195 200 205	
gat att aca gag cgt ctc atc ctc cct agg ttt tgt gag atg tgc tgt	672
Asp Ile Thr Glu Arg Leu Ile Leu Pro Arg Phe Cys Glu Met Cys Cys	
210 215 220	
gac tgt aga atg ttt cac gtc cga aag gtc tgt gct gcc aat ttt gga	720
Asp Cys Arg Met Phe His Val Arg Lys Val Cys Ala Ala Asn Phe Gly	
225 230 235	
gac att tgc agc gta gtt ggc cag caa gct aca gaa gaa atg ctg ctg	768
Asp Ile Cys Ser Val Val Gly Gln Gln Ala Thr Glu Glu Met Leu Leu	
240 245 250	

15/23

ccc agg ttc ttc cag ctg tgt tct gac aat gtg tgg ggc gtc cgg aag	816
Pro Arg Phe Phe Gln Leu Cys Ser Asp Asn Val Trp Gly Val Arg Lys	
255 260 265 270	
gcc tgt gct gag tgc ttc atg gcc gtc tcc tgc gcg aca tgc caa gaa	864
Ala Cys Ala Glu Cys Phe Met Ala Val Ser Cys Ala Thr Cys Gln Glu	
275 280 285	
atc cga cgg aca aag ttg tca gca ctg ttt att aac ttg atc agt gat	912
Ile Arg Arg Thr Lys Leu Ser Ala Leu Phe Ile Asn Leu Ile Ser Asp	
290 295 300	
cct tca cgt tgg gtt cgc caa gca gcc ttt cag tcc ctg ggg cct ttc	960
Pro Ser Arg Trp Val Arg Gln Ala Ala Phe Gln Ser Leu Gly Pro Phe	
305 310 315	
ata tcc aca ttt gct aat cca tca agc tcg ggc cag tgc ttc aaa gat	1008
Ile Ser Thr Phe Ala Asn Pro Ser Ser Ser Gly Gln Cys Phe Lys Asp	
320 325 330	
gag agc aaa agc tca gaa gac aaa gac agg atc aga gac gat ggt gtt	1056
Glu Ser Lys Ser Ser Glu Asp Lys Asp Arg Ile Arg Asp Asp Gly Val	
335 340 345 350	
gta caa gaa gag cag agc agg cca gag gac gca cct tca gac ctc agt	1104
Val Gln Glu Glu Gln Ser Arg Pro Glu Asp Ala Pro Ser Asp Leu Ser	
355 360 365	
gcc cct cac tcc agt gcc agg ctg gac ggc aca ctt gaa ggc tgt gct	1152
Ala Pro His Ser Ser Ala Arg Leu Asp Gly Thr Leu Glu Gly Cys Ala	
370 375 380	
gcc gag acg cct ggg gac tct gca ggt gac atg cgt gtt cca gcg gac	1200
Ala Glu Thr Pro Gly Asp Ser Ala Gly Asp Met Arg Val Pro Ala Asp	
385 390 395	
agc tcc tta ctc tgt act ttg tcc tca gag tct cct cag gaa gca gct	1248
Ser Ser Leu Leu Cys Thr Leu Ser Ser Glu Ser Pro Gln Glu Ala Ala	
400 405 410	
agt gac gct gag agt ggt aaa aag cac gat aac aac agc aag tct gcg	1296
Ser Asp Ala Glu Ser Gly Lys Lys His Asp Asn Asn Ser Lys Ser Ala	
415 420 425 430	
tcc cgg cca gac gtt ggc acc agc tcc cca gag ccc act ccc tta gat	1344
Ser Arg Pro Asp Val Gly Thr Ser Ser Pro Glu Pro Thr Pro Leu Asp	
435 440 445	

16/23

cag gaa atg ttc aac tcc ttc cat ttc tgg agg act cct cta ccc cag	1392
Gln Glu Met Phe Asn Ser Phe His Phe Trp Arg Thr Pro Leu Pro Gln	
450 455 460	
ata gat ctt gat aaa gag ctc caa cag gac cct ggg gag agg ccc agc	1440
Ile Asp Leu Asp Lys Glu Leu Gln Gln Asp Pro Gly Glu Arg Pro Ser	
465 470 475	
cca gag aga aca gga gat gca cct gca gcc cct gta cca ggt tct ccc	1488
Pro Glu Arg Thr Gly Asp Ala Pro Ala Ala Pro Val Pro Gly Ser Pro	
480 485 490	
agt atc acc atg gct acc cgg aag gaa cta gaa gaa atg ata gaa aac	1536
Ser Ile Thr Met Ala Thr Arg Lys Glu Leu Glu Glu Met Ile Glu Asn	
495 500 505 510	
cta gag ccg cac atg gat gac ccg gat gtt aaa gcc cag gtg gaa gtg	1584
Leu Glu Pro His Met Asp Asp Pro Asp Val Lys Ala Gln Val Glu Val	
515 520 525	
ctg tcg gcc gcc ctg cgc gct tct acc ctg gat gct cac gac gag gct	1632
Leu Ser Ala Ala Leu Arg Ala Ser Thr Leu Asp Ala His Asp Glu Ala	
530 535 540	
ggc ggt gca gag cag cgg agt gag ctg cag gac gac gca gtg ggt gcc	1680
Gly Gly Ala Glu Gln Arg Ser Glu Leu Gln Asp Asp Ala Val Gly Ala	
545 550 555	
ggc ggc gag ctt cca aac tgt agc atc agc gaa gac act tct gag cct	1728
Gly Gly Glu Leu Pro Asn Cys Ser Ile Ser Glu Asp Thr Ser Glu Pro	
560 565 570	
ctg gtc atc gct gct gag gag aat atg gag gcc act cct gac tat atc	1776
Leu Val Ile Ala Ala Glu Glu Asn Met Glu Ala Thr Pro Asp Tyr Ile	
575 580 585 590	
cat gga ggt gcg gat gta ggc ccc ggt ggc ggt ggt ggc ttc agc ccg	1824
His Gly Gly Ala Asp Val Gly Pro Gly Gly Gly Gly Gly Phe Ser Pro	
595 600 605	
gat gaa gag agg aga ccc aaa gtc cag gat gtc gta cca caa gcg tta	1872
Asp Glu Glu Arg Arg Pro Lys Val Gln Asp Val Val Pro Gln Ala Leu	
610 615 620	
cta gac cag tac ctg tca atg acc gac cct tct cga gca cag aca gtc	1920
Leu Asp Gln Tyr Leu Ser Met Thr Asp Pro Ser Arg Ala Gln Thr Val	
625 630 635	

17/23

gac	acc	gag	atc	gct	aag	cac	tgt	gca	tac	agt	ctg	ccg	ggg	gtg	gct	1968
Asp	Thr	Glu	Ile	Ala	Lys	His	Cys	Ala	Tyr	Ser	Leu	Pro	Gly	Val	Ala	
	640					645					650					
ctg	acc	ctt	ggc	aga	cag	aac	tgg	cac	tgc	ttg	aga	gag	act	tac	gag	2016
Leu	Thr	Leu	Gly	Arg	Gln	Asn	Trp	His	Cys	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Glu	
655					660					665					670	
acc	cta	gcg	tca	gac	atg	cag	tgg	aaa	gtt	cga	aga	act	ctg	gcc	ttc	2064
Thr	Leu	Ala	Ser	Asp	Met	Gln	Trp	Lys	Val	Arg	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	
				675					680					685		
tcc	atc	cat	gag	ctc	gcg	gtg	att	ctc	ggg	gac	cag	ctg	aca	gca	gca	2112
Ser	Ile	His	Glu	Leu	Ala	Val	Ile	Leu	Gly	Asp	Gln	Leu	Thr	Ala	Ala	
			690					695					700			
gac	ctg	gtt	ccg	att	ttt	aat	ggg	ttt	tta	aaa	gat	ctt	gac	gaa	gtc	2160
Asp	Leu	Val	Pro	Ile	Phe	Asn	Gly	Phe	Leu	Lys	Asp	Leu	Asp	Glu	Val	
	705						710					715				
agg	ata	ggg	gtt	ctc	aaa	cac	ttg	cat	gac	ttt	ctg	aag	ctt	ctt	cat	2208
Arg	Ile	Gly	Val	Leu	Lys	His	Leu	His	Asp	Phe	Leu	Lys	Leu	Leu	His	
	720					725					730					
att	gat	aaa	aga	aga	gag	tac	ctt	tat	caa	ctc	cag	gag	ttt	ttg	gtg	2256
Ile	Asp	Lys	Arg	Arg	Glu	Tyr	Leu	Tyr	Gln	Leu	Gln	Glu	Phe	Leu	Val	
735					740					745					750	
aca	gac	aac	agt	aga	aat	tgg	cgg	ttt	cga	gct	gaa	ctg	gca	gaa	cag	2304
Thr	Asp	Asn	Ser	Arg	Asn	Trp	Arg	Phe	Arg	Ala	Glu	Leu	Ala	Glu	Gln	
				755					760					765		
ctg	att	tta	ctt	cta	gaa	tta	tat	agt	ccc	aga	gat	gtt	tat	gat	tac	2352
Leu	Ile	Leu	Leu	Leu	Glu	Leu	Tyr	Ser	Pro	Arg	Asp	Val	Tyr	Asp	Tyr	
			770					775					780			
tta	cgt	ccc	att	gct	ctg	aat	ctg	tgt	gca	gac	aaa	gtt	tct	tca	gtc	2400
Leu	Arg	Pro	Ile	Ala	Leu	Asn	Leu	Cys	Ala	Asp	Lys	Val	Ser	Ser	Val	
	785					790						795				
cgt	tgg	att	tcc	tac	aag	ttg	gtc	agt	gag	atg	gtg	aag	aag	cta	cac	2448
Arg	Trp	Ile	Ser	Tyr	Lys	Leu	Val	Ser	Glu	Met	Val	Lys	Lys	Leu	His	
	800					805					810					
atg	gcg	acg	ccg	cca	acg	ttc	gga	gtc	gag	ctc	atc	aat	gag	ctg	gtg	2496
Met	Ala	Thr	Pro	Pro	Thr	Phe	Gly	Val	Glu	Leu	Ile	Asn	Glu	Leu	Val	
815					820					825					830	

18/23

gag aac ttc ggc agg tgt cca aag tgg tgc ggc cgg cag gcc ttc gtc	2544
Glu Asn Phe Gly Arg Cys Pro Lys Trp Ser Gly Arg Gln Ala Phe Val	
835 840 845	
ttc gtg tgc cag act gtc att gag gac gac tgc ctc ccc atg gac cag	2592
Phe Val Cys Gln Thr Val Ile Glu Asp Asp Cys Leu Pro Met Asp Gln	
850 855 860	
ttt gct gtg cac ctg atg cca cat ttg ctg acc ttg gca aat gac agg	2640
Phe Ala Val His Leu Met Pro His Leu Leu Thr Leu Ala Asn Asp Arg	
865 870 875	
gtt ccc aac gtt aga gtg ctg ctt gca aaa acc ctt cga cag act cta	2688
Val Pro Asn Val Arg Val Leu Leu Ala Lys Thr Leu Arg Gln Thr Leu	
880 885 890	
cta gag aaa gaa tac ttc tta gcc tct gcc agc tgt cat cag gag gcc	2736
Leu Glu Lys Glu Tyr Phe Leu Ala Ser Ala Ser Cys His Gln Glu Ala	
895 900 905 910	
gtg gag cag aca atc atg gcc ctt cag atg gat cga gac agt gac gtc	2784
Val Glu Gln Thr Ile Met Ala Leu Gln Met Asp Arg Asp Ser Asp Val	
915 920 925	
aag tac ttt gca agc atc cac ccg tcc agt acc aaa ctc tct gaa gac	2832
Lys Tyr Phe Ala Ser Ile His Pro Ser Ser Thr Lys Leu Ser Glu Asp	
930 935 940	
gca atg agt aca gct tcc tcc acc tac tga cccctgaccc acggtgtcct	2882
Ala Met Ser Thr Ala Ser Ser Thr Tyr	
945 950	
tcctgcatcc gcgagagcct ggcctcagcc gcctgcgcca ctcgggacag ctgttggtggt	2942
ggggccctccc tcctgccagc tcattcgcag gtgcaagtgg cctactccca taccagtgg	3002
tttaagagtc aagagaaagt acagtaaaca ctattatctt atcttgactt agggaaagta	3062
aactctcaga ggattataat tgtcaccaaa gccttaactc attacttcct cttcctgact	3122
gaatgacttg aattggcaga gcattttccc ttcgggaagg aggargttcc cagagacctg	3182
cgctgctttc tcctgggtttt atttaacgnt ggtaaatggc attcttaccg ccggaagggtg	3242
gacacgcacc ggacagggag gcctgggtat tagcccaagc acttgtccca ggtgcgagtc	3302
tgctcggctc ntgggctgcc ctgcccagcc ctaagtgtga atagtcttg gcgtgtataa	3362
atgacaggag tttttcctct cctaagggtc tgatgttaac actaagtaga atntgatttt	3422
gactcctaatt gcagcacatt gctgtacaca ttacagaat gtttcagac tctctccga	3482
ctcttttcat gctggtcatg acgtgaaggg gacttctcag cagatattgt gtcagggtgtt	3542
cttaacttga tcatggtcag ctctgaggtg cgactttcct tcccatgctg cacaccctg	3602
tggccacgct ggggcatgca gccttaatca tgctgttaga actgttgttg cacaag	3658

19/23

<211> 951

<212> DNA

<213> RATTUS NORVEGICUS

<400> 12

Met Ala Asp Leu Ser Leu Leu Gln Glu Asp Leu Pro Glu Asp Ala Asp
 1 5 10 15

Gly Leu Gly Val Asp Asp Tyr Ser Ser Glu Ser Asp Val Ile Ile Ile
 20 25 30

Pro Ser Ala Leu Asp Phe Val Ser Gln Asp Glu Met Leu Thr Pro Leu
 35 40 45

Gly Arg Leu Asp Lys Tyr Ala Ala Ser Glu Asn Val Phe Asn Arg Gln
 50 55 60

Met Val Ala Arg Ser Leu Leu Asp Thr Leu Arg Glu Val Cys Gly Glu
 65 70 75 80

Glu Arg Asp Cys Ile Ala Val Leu Glu Arg Ile Ser Arg Leu Ala Asp
 85 90 95

Asp Ser Glu Pro Thr Val Arg Ala Glu Leu Met Glu Gln Val Pro His
 100 105 110

Ile Ala Leu Phe Cys Gln Glu Asn Arg Pro Ser Ile Pro Tyr Ala Phe
 115 120 125

Ser Lys Tyr Leu Leu Pro Ile Val Val Arg Tyr Leu Ala Asp Gln Asn
 130 135 140

Asn Gln Val Arg Lys Thr Ser Gln Ala Ala Leu Leu Ala Leu Leu Glu
 145 150 155 160

Gln Glu Leu Ile Glu Arg Leu Asp Val Glu Thr Lys Val Cys Pro Val
 165 170 175

Leu Ile Asp Leu Thr Ala Pro Asp Ser Asn Asp Asp Val Lys Thr Glu
 180 185 190

Ala Val Ala Ile Met Cys Lys Met Ala Pro Met Val Gly Lys Asp Ile
 195 200 205

Thr Glu Arg Leu Ile Leu Pro Arg Phe Cys Glu Met Cys Cys Asp Cys
 210 215 220

Arg Met Phe His Val Arg Lys Val Cys Ala Ala Asn Phe Gly Asp Ile

20/23

225					230						235					240
Cys	Ser	Val	Val	Gly	Gln	Gln	Ala	Thr	Glu	Glu	Met	Leu	Leu	Pro	Arg	
				245					250					255		
Phe	Phe	Gln	Leu	Cys	Ser	Asp	Asn	Val	Trp	Gly	Val	Arg	Lys	Ala	Cys	
			260					265					270			
Ala	Glu	Cys	Phe	Met	Ala	Val	Ser	Cys	Ala	Thr	Cys	Gln	Glu	Ile	Arg	
		275					280					285				
Arg	Thr	Lys	Leu	Ser	Ala	Leu	Phe	Ile	Asn	Leu	Ile	Ser	Asp	Pro	Ser	
	290					295					300					
Arg	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Ala	Phe	Gln	Ser	Leu	Gly	Pro	Phe	Ile	Ser	
305					310					315						320
Thr	Phe	Ala	Asn	Pro	Ser	Ser	Ser	Gly	Gln	Cys	Phe	Lys	Asp	Glu	Ser	
				325					330					335		
Lys	Ser	Ser	Glu	Asp	Lys	Asp	Arg	Ile	Arg	Asp	Asp	Gly	Val	Val	Gln	
			340					345					350			
Glu	Glu	Gln	Ser	Arg	Pro	Glu	Asp	Ala	Pro	Ser	Asp	Leu	Ser	Ala	Pro	
		355					360					365				
His	Ser	Ser	Ala	Arg	Leu	Asp	Gly	Thr	Leu	Glu	Gly	Cys	Ala	Ala	Glu	
	370					375					380					
Thr	Pro	Gly	Asp	Ser	Ala	Gly	Asp	Met	Arg	Val	Pro	Ala	Asp	Ser	Ser	
385					390					395						400
Leu	Leu	Cys	Thr	Leu	Ser	Ser	Glu	Ser	Pro	Gln	Glu	Ala	Ala	Ser	Asp	
				405					410					415		
Ala	Glu	Ser	Gly	Lys	Lys	His	Asp	Asn	Asn	Ser	Lys	Ser	Ala	Ser	Arg	
			420					425					430			
Pro	Asp	Val	Gly	Thr	Ser	Ser	Pro	Glu	Pro	Thr	Pro	Leu	Asp	Gln	Glu	
		435					440					445				
Met	Phe	Asn	Ser	Phe	His	Phe	Trp	Arg	Thr	Pro	Leu	Pro	Gln	Ile	Asp	
	450					455					460					
Leu	Asp	Lys	Glu	Leu	Gln	Gln	Asp	Pro	Gly	Glu	Arg	Pro	Ser	Pro	Glu	
465					470					475					480	
Arg	Thr	Gly	Asp	Ala	Pro	Ala	Ala	Pro	Val	Pro	Gly	Ser	Pro	Ser	Ile	

21/23

485										490					495				
Thr	Met	Ala	Thr	Arg	Lys	Glu	Leu	Glu	Glu	Met	Ile	Glu	Asn	Leu	Glu				
			500					505					510						
Pro	His	Met	Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Lys	Ala	Gln	Val	Glu	Val	Leu	Ser				
		515					520					525							
Ala	Ala	Leu	Arg	Ala	Ser	Thr	Leu	Asp	Ala	His	Asp	Glu	Ala	Gly	Gly				
		530				535					540								
Ala	Glu	Gln	Arg	Ser	Glu	Leu	Gln	Asp	Asp	Ala	Val	Gly	Ala	Gly	Gly				
545					550					555					560				
Glu	Leu	Pro	Asn	Cys	Ser	Ile	Ser	Glu	Asp	Thr	Ser	Glu	Pro	Leu	Val				
				565					570					575					
Ile	Ala	Ala	Glu	Glu	Asn	Met	Glu	Ala	Thr	Pro	Asp	Tyr	Ile	His	Gly				
			580					585					590						
Gly	Ala	Asp	Val	Gly	Pro	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Phe	Ser	Pro	Asp	Glu				
		595					600					605							
Glu	Arg	Arg	Pro	Lys	Val	Gln	Asp	Val	Val	Pro	Gln	Ala	Leu	Leu	Asp				
		610				615					620								
Gln	Tyr	Leu	Ser	Met	Thr	Asp	Pro	Ser	Arg	Ala	Gln	Thr	Val	Asp	Thr				
625					630					635					640				
Glu	Ile	Ala	Lys	His	Cys	Ala	Tyr	Ser	Leu	Pro	Gly	Val	Ala	Leu	Thr				
				645					650					655					
Leu	Gly	Arg	Gln	Asn	Trp	His	Cys	Leu	Arg	Glu	Thr	Tyr	Glu	Thr	Leu				
			660					665					670						
Ala	Ser	Asp	Met	Gln	Trp	Lys	Val	Arg	Arg	Thr	Leu	Ala	Phe	Ser	Ile				
		675					680					685							
His	Glu	Leu	Ala	Val	Ile	Leu	Gly	Asp	Gln	Leu	Thr	Ala	Ala	Asp	Leu				
		690				695					700								
Val	Pro	Ile	Phe	Asn	Gly	Phe	Leu	Lys	Asp	Leu	Asp	Glu	Val	Arg	Ile				
705					710					715					720				
Gly	Val	Leu	Lys	His	Leu	His	Asp	Phe	Leu	Lys	Leu	Leu	His	Ile	Asp				
				725					730					735					
Lys	Arg	Arg	Glu	Tyr	Leu	Tyr	Gln	Leu	Gln	Glu	Phe	Leu	Val	Thr	Asp				

22/23

	740		745		750	
Asn Ser Arg	Asn Trp Arg Phe	Arg Ala Glu Leu Ala	Glu Gln Leu Ile			
	755	760	765			
Leu Leu Leu Glu Leu Tyr	Ser Pro Arg Asp Val Tyr	Asp Tyr Leu Arg				
	770	775	780			
Pro Ile Ala Leu Asn Leu Cys Ala Asp Lys	Val Ser Ser Val Arg Trp					
	785	790	795	800		
Ile Ser Tyr Lys Leu Val Ser Glu Met	Val Lys Lys Leu His Met	Ala				
	805	810	815			
Thr Pro Pro Thr Phe Gly Val Glu Leu Ile Asn Glu Leu Val Glu Asn						
	820	825	830			
Phe Gly Arg Cys Pro Lys Trp Ser Gly Arg Gln Ala Phe Val Phe Val						
	835	840	845			
Cys Gln Thr Val Ile Glu Asp Asp Cys Leu Pro Met Asp Gln Phe Ala						
	850	855	860			
Val His Leu Met Pro His Leu Leu Thr Leu Ala Asn Asp Arg Val Pro						
	865	870	875	880		
Asn Val Arg Val Leu Leu Ala Lys Thr Leu Arg Gln Thr Leu Leu Glu						
	885	890	895			
Lys Glu Tyr Phe Leu Ala Ser Ala Ser Cys His Gln Glu Ala Val Glu						
	900	905	910			
Gln Thr Ile Met Ala Leu Gln Met Asp Arg Asp Ser Asp Val Lys Tyr						
	915	920	925			
Phe Ala Ser Ile His Pro Ser Ser Thr Lys Leu Ser Glu Asp Ala Met						
	930	935	940			
Ser Thr Ala Ser Ser Thr Tyr						
	945	950				

<210> 13

<211> 1132

<212> DNA

<213> RATTUS NORVEGICUS

<400> 13

gtctcctgcg cgacatgccg agaaatccga cggacaaagt tgtcagcact gtttattaac

60

ttgatcagtg	atccttcacg	ttgggttcgc	caagcagcct	ttcagtcctt	ggggcctttc	120
atatccacat	ttgctaatac	atcaagctcg	ggccagtgct	tcaaagatga	gagcaaaagc	180
tcagaagaca	aagacaggat	cagagacgat	ggtgttgtac	aagaagagca	gagcaggcca	240
gaggacgcac	cttcagacct	cagtgccctt	cactccagtg	ccaggctgga	cggcacactt	300
gaaggctgtg	ctgccgagac	gcctggggac	tctgcagggt	acatgcgtgt	tccagcggac	360
agctccttac	tctgtacttt	gtcctcagag	tctcctcagg	aagcagctag	tgacgctgag	420
agtggtaaaa	agcacgataa	caacagcaag	tctgcgtccc	ggccagacgt	tggcaccagc	480
tccccagagc	ccactccctt	agatcaggaa	atgttcaact	ccttccattt	ctggaggact	540
cctctacccc	agatagatct	tgataaagag	ctccaacagg	accctgggga	gaggcccagc	600
ccagagagaa	caggagatgc	acctgcagcc	cctgtaccag	gttctcccag	tatcaccatg	660
gctacccgga	aggaactaga	agaaatgata	gaaaacctag	agccgcacat	ggatgaccgg	720
gatgtttaaag	cccagggtgga	agtgcctgtc	gccgccctgc	gcgcttctac	cctggatgct	780
cacgacgagg	ctggcgggtgc	agagcagcgg	agtgcagctg	aggacgacgc	agtgggtgcc	840
ggcggcgagc	ttccaaactg	tagcatcagc	gaagacactt	ctgagcctct	ggtcatcgct	900
gctgaggaga	atatggaggc	cactcctgac	tatatccatg	gaggtgcgga	tgtaggcccc	960
ggtggcgggtg	gtggcttcag	cccggatgaa	gagaggagac	ccaaagtcca	ggatgtcgtg	1020
ccacaagcgt	tactagacca	gtacctgtca	atgaccgacc	cttctcgagc	acagacagtc	1080
gacaccgaga	tcgctaagca	ctgtgcatac	agtctgccgg	gtgtggctct	ga	1132

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/05551

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00,
C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68, A01K67/027, G01N33/53, G01N33/50

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C07K14/47

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq
SwissProt/PIR/GeneSeq
BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Susanne Kloecker et al., "Purification and Identification of a Novel Subunit of Protein Serine/Threonine Phosphatase 4", J. Biol. Chem. (February, 1999), Vol. 274, No. 9, pp. 5339-5347,	1-21
A	Miyata Toshio et al., "A Mesangium-predominant Gene, Megsin, is a New Serpin Upregulated in IgA Nephropathy", Journal of Clinical Investigation (1998), Vol. 102, No. 4, pp. 828-836,	1-21
A	WO, 97/26000, A1 (BIOGEN INT), 24 July, 1997 (24.07.97) & EP, 874637, A1 & AU, 9717488, A & JP, 2000-503659, A	1-21

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
22 November, 2000 (22.11.00)

Date of mailing of the international search report
12 December, 2000 (12.12.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1⁷ C12N15/12, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/00, C12Q1/68, C07K14/47, C07K16/18, C12Q1/68, A01K67/027, G01N33/53, G01N33/50

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. C1⁷ C12N15/12, C07K14/47

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

GenBank/EMBL/DDBJ/GenSeq

SwissProt/PIR/GenSeq

BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J. Biol. Chem. (Feb. 1999), Vol. 274, No. 9, p. 5339-5347, Susanne Klöcker et al. "Purification and Identification of a Novel Subunit of Protein Serine/Threonine Phosphatase 4"	1-21
A	Journal of Clinical Investigation (1998), Vol. 102, No. 4, p. 828-836, Miyata Toshio et al. "A Mesangium-predominant Gene, Megsin, is a New Serpin Upregulated in IgA Nephropathy"	1-21
A	WO, 97/26000, A1 (BIOGEN INT) 24. 7月. 1997 (24. 07. 97) & EP, 874637, A1 & AU, 9717488, A & JP, 2000-503659, A	1-21

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

22. 11. 00

国際調査報告の発送日

12.12.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

印

4N 8114

電話番号 03-3581-1101 内線 3448